

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Marija Zovko

781/PI

**ODREĐIVANJE UDJELA
HISTAMINA U MARINIRANOJ
RIBI RAMAN
SPEKTROSKOPIJOM I HPLC
METODOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Sanje Vidaček te uz pomoć višeg asistenta dr. sc. Tibora Janči.

Svevremeni Horacije u svojim epistolama kaže „Dimidium facti qui coepit habet“ ili polovicu djela, onaj koji je započeo, već ima...

Stoga, najiskrenije i veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Sanji Vidaček te višem asistentu dr.sc. Tiboru Janči koji su mi svojim znanjem, savjetima i razumijevanjem pomogli u izboru teme, provođenju istraživanja te oblikovanju i pisanju rada.

Posebno hvala mojim roditeljima, bratu i sestri koji su me, svojom ljubavlju i podrškom, ohrabrivali i uvijek vjerovali u mene. Hvala Vam što ste mi omogućili bezbrižno odrastanje i školovanje.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE UDJELA HISTAMINA U MARINIRANOJ RIBI RAMAN SPEKTROSKOPIJOM I HPLC METODOM

Marija Zovko, 781/PI

Sažetak: Standardi sigurnosti hrane zahtijevaju detekciju spojeva koji, čak i u tragovima, mogu utjecati na zdravlje ljudi. U ovu skupinu tvari pripadaju i biogeni amini, a jedan od najproučavanijih je histamin. Histamin se rijetko nalazi u svježoj ribi, međutim njegov udio raste s razvojem procesa bakterijske razgradnje ribe, te se histamin može smatrati indikatorom kvarenja ribe. Mariniranje je jedan od načina prerade ribljeg mesa kojim se, zahvaljujući djelovanju kombinacije octene kiseline i soli te drugih sastojaka marinade, zadržava djelovanje bakterija i enzima. Iako se snažan inhibitorski učinak marinade na bakterije i enzime povećava s povećanjem koncentracije, razvoj histamina moguć je i u mariniranoj ribi. Postoji više metoda za identifikaciju i kvantifikaciju odnosno određivanje udjela histamina u ribi. U ovom radu ispitivana je primjena Raman spektroskopije tj. spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS metode) i referentne HPLC metode kod određivanja udjela histamina u uzorcima marinirane ribe, te je izvršena usporedba dobivenih rezultata i podudarnosti korištenih metoda. Usporedba rezultata SERS metode i referentne HPLC metode pokazala je da je najveća točnost postignuta primjenom modela dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1264 cm^{-1} i 1570 cm^{-1} u rasponu koncentracija $0 - 200\text{ mg kg}^{-1}$. SERS metoda omogućava analizu histamina u uzorcima ribe uz značajno smanjene troškove te skraćuje vrijeme potrebno za analizu (30 min) u usporedbi s referentnom HPLC metodom (140 min).

Ključne riječi: biogeni amini, histamin, marinirana riba, Raman spektroskopija, HPLC

Rad sadrži: 39 stranica, 17 slika, 4 tablice, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Sanja Vidaček

Pomoćpri izradi: dr. sc. Tibor Janči, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak
2. Izv. prof. dr. sc. Sanja Vidaček
3. Doc. dr. sc. Nikolina Čukelj
4. Doc. dr. sc. Leo Gracin (zamjena)

Datum obrane: 29. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of food technology
Laboratory for Meat and Fish

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF HISTAMINE CONTENT IN MARINATED FISH WITH RAMAN SPECTROSCOPY AND HPLC METHOD

Marija Zovko, 781/PI

Abstract: Food safety standards require detection of compounds that even at trace levels, may affect human health. This group of substances also includes the biogenic amines, and one of the most prominent is histamine. Histamine is rarely found in fresh fish but its share is growing with the development of bacterial degradation, thus histamine can be considered an indicator of fish degradation. Marinating is one method of fish processing, which, by combination of acetic acid, salt and other marinade ingredients keeps under control the bacteria and enzymes activity. Although the potent inhibitory effect of marinades on bacteria and enzymes increases with increasing concentrations, histamine development is also possible in marinated fish. There are several methods for identifying and quantifying histamine in fish. This thesis investigated the application of Raman spectroscopy apropos Surface Enhanced Raman Scattering (SERS method) and reference HPLC method to determine the histamine content in marinated fish samples, and compared the obtained results and the correlation of the methods used. Results of the SERS method and the reference HPLC method showed that the highest accuracy was achieved by applying a linear model regression based on the intensity of the SERS band of histamine at 1264 cm^{-1} and 1570 cm^{-1} in the range of $0 - 200\text{ mg kg}^{-1}$. The SERS method allows analysis of histamine in fish samples at significantly reduced costs and shortens the time required for analysis (30 min) compared to the reference HPLC method (140 min).

Keywords: biogenic amines, histamine, marinated fish, Raman spectroscopy, HPLC

Thesis contains: 39 pages, 17 figures, 4 tables, 48 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Sanja Vidaček, Associate Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Tibor Janči, Senior Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Anet Režek Jambrak*, Associate Professor
2. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate Professor
3. PhD. *Nikolina Čukelj*, Assistant Professor
4. PhD. *Leo Gracin*, Assistant Professor (substitute)

Thesis defended: 29 September 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIOGENI AMINI	2
2.1.1. Histamin	4
2.1.2. Granične vrijednosti histamina u ribi i ribljim prerađevinama	7
2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE RAZINE HISTAMINA U RIBI	9
2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	10
2.2.2. Raman spektroskopija	13
2.2.3. Primjena Raman spektroskopije u određivanju histamina	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
3.2. MATERIJALI	17
3.2.1. Uzorci ribe.....	17
3.2.3. Reagensi	17
3.2.4. Laboratorijska oprema.....	18
3.3. METODE RADA	18
3.3.1. Određivanje histamina HPLC metodom	18
3.3.2. Određivanje histamina Raman spektroskopijom.....	20
3.3.3. Usporedba HPLC i SERS metode	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. REZULTATI.....	23
4.1.1. Udjel histamina kvantificiran HPLC metodom.....	23
4.1.2. Udjel histamina kvantificiran SERS metodom	25
4.2. RASPRAVA.....	30
4.2.1. Usporedba rezultata dobivenih SERS i HPLC metodom	30
4.2.2. Usporedni prikaz tijeka postupka kod SERS i HPLC metode	32
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA.....	36

1. UVOD

Riba predstavlja hranu koja pripada skupini najkvalitetnijih namirnica i od davnina zauzima značajno mjesto u ljudskoj prehrani. Riblje meso ispunjava tri osnovna zahtjeva koji neku namirnicu čine visoko vrijednom, a to su laka probavljivost, prehrambeno-fiziološki povoljan omjer aminokiselina te bogat sadržaj vitamina i mineralnih tvari.

Usprkos činjenici da je riba vrijedna po zdravlje ljudi i važna namirnica animalnog podrijetla, različiti kemijski, biokemijski i mikrobiološki procesi odmah nakon ulova uvjetuju postmortalne promjene koje dovode u pitanje njezinu svježinu, zdravstvenu ispravnost, kakvoću i održivost. Stoga su načini prerade i kontrole ribljeg mesa najčešće znatno rigorozniji negokod drugih vrsta mesa.

Jedan od načina prerade ribljeg mesa je i mariniranje. Mariniranje spada u kemijske metode konzerviranja, a kao i kod soljenja, za mariniranje se upotrebljava sol kao sredstvo za konzerviranje, ali pojačana octenom kiselinom i raznim začinima. Osnovni učinak mariniranja temelji se na djelovanju kombinacije octene kiseline i soli te drugih sastojaka marinade koja zadržava djelovanje bakterija i enzima, a ovaj postupak utječe i na mekoću mesa, promjenu ukusa, teksturu proizvoda (promjena strukture), što sve doprinosi specifičnom mirisu i ukusu, ali i produljenju roka trajanja ribljeg mesa. Snažan inhibitorski učinak marinade na bakterije i enzime raste s povećanjem koncentracije.

Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina, a u ribi se oblikuje postmortalnom bakterijskom dekarboksilacijom esencijalne aminokiseline histidina koju vrši enzim histidin-dekarboksilaza.

Postoji više metoda za identifikaciju i kvantifikaciju odnosno određivanje udjela histamina u ribi. U državama Europske unije analitička potvrdna metoda za analizu histamina u ribi je tradicionalna laboratorijska metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, a u posljednje vrijeme primjetan je i velik interes za primjenu brzih, neinvazivnih metoda poput Raman spektroskopije.

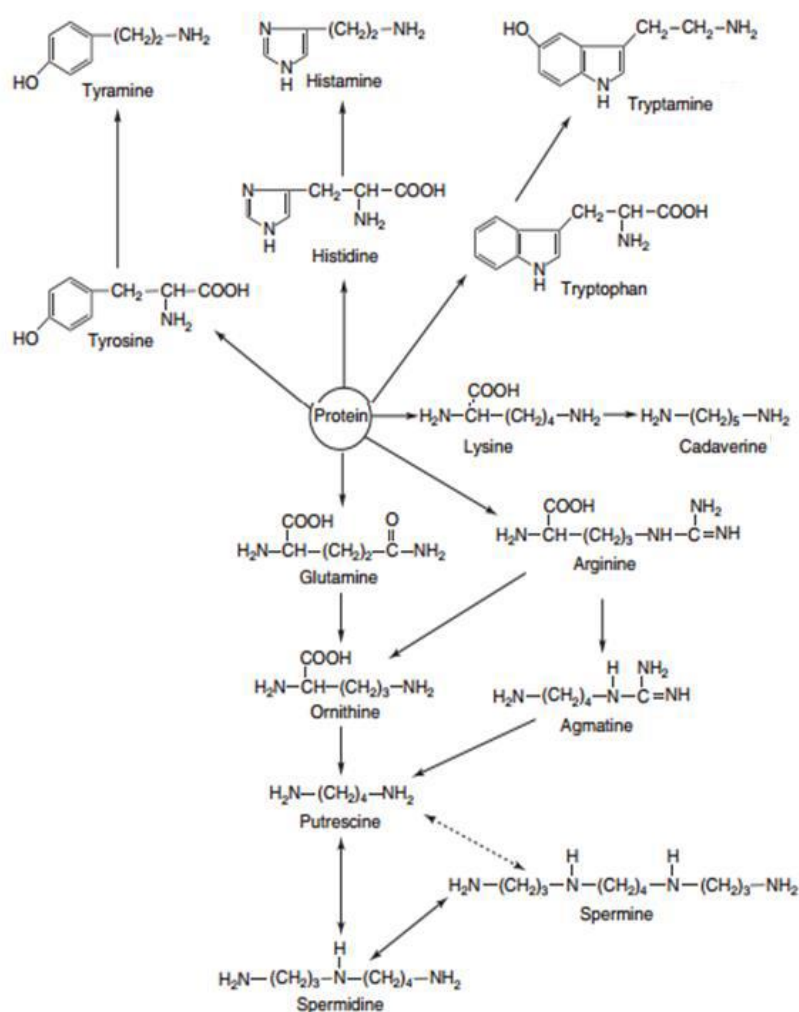
Osnovni cilj ovog rada je detekcija i kvantifikacija odnosno određivanje udjela histamina u uzorcima marinirane ribe primjenom Raman spektroskopije tj. spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS metode) i potvrdne laboratorijske HPLC metode te usporedba dobivenih rezultata i podudarnosti korištenih metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOGENI AMINI

Biogeni amini su organske baze s alifatskim (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatskim (tiramin, feniletilamin) ili heterocikličkim (histamin, triptamin) strukturama (Karovičova i Kohajdova, 2005). Budući da su u svježoj ribi zastupljeni u vrlo malim količinama, a tijekom vremena skladištenja i pod nepovoljnim uvjetima skladištenja količina im se povećava, njihova se prisutnost u mesu ribe smatra izvrsnim pokazateljem stupnja svježine (Dalgaard i Emborg, 2009). Nastaju dekarboksilacijom aminokiselina i mogu se očekivati u svakoj hrani koja sadrži proteine ili slobodne aminokiseline, a podvrgnuta je procesima koji omogućavaju mikrobiološku ili biokemijsku aktivnost. Proces je ovisan o specifičnim bakterijskim vrstama, a količina stvorenih biogenih amina ovisi o razini aktivnosti dekarboksilaza i dostupnosti aminokiselina (Rivas i sur., 2008).

Slika 1 prikazuje metabolički put nastajanja biogenih amina u ribi.



Slika 1. Metabolički put nastajanja biogenih amina u ribi (Mendes, 2009)

Preduvjeti za nastajanje biogenih amina djelovanjem mikroorganizama jesu dostupnost slobodnih aminokiselina; prisutnost enzima dekarboksilaza u mikroorganizmu te uvjeti koji omogućuju rast bakterija i aktivnost dekarboksilaze (Mendes, 2009). Ova kombinacija preduvjeta može dovesti do vrlo promjenjivih razina histamina unutar pojedinih vrsta ribe, pa čak i unutar riblje jedinke budući da histamin nije jednako raspoređen po cijeloj ribi.

Biogeni amini su spojevi relativno malih molekulskih masa koji nastaju mikrobnom aktivnošću koja se prirodno odvija u hrani i pićima. U nefermentiranim namirnicama poput voća, povrća, mesa, mlijeka i ribe, endogenog su podrijetla i tada se nalaze u niskim koncentracijama. Visoke koncentracije biogenih amina mogu se naći u fermentiranoj hrani kao rezultat kontaminirajuće mikroflore. Njihova se aktivnost obično povećava za vrijeme kontrolirane ili spontane mikrobne fermentacije hrane ili tijekom kvarenja hrane. Budući da su u svježoj ribi zastupljeni u vrlo malim količinama, a količina im se povećava tijekom vremena skladištenja i pri nepovoljnim uvjetima skladištenja, prisutnost biogenih amina u mesu ribe smatra se izvrsnim pokazateljem stupnja svježine ribe (Dalgaard i Emborg, 2009).

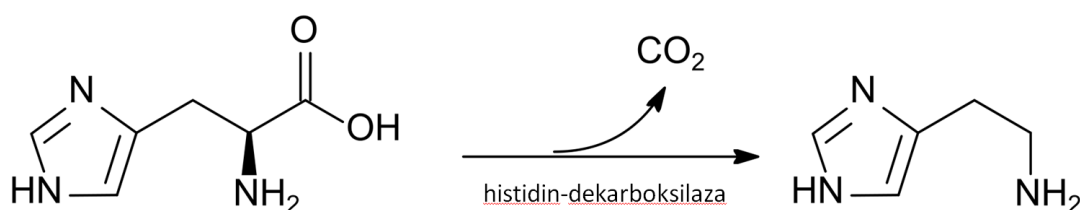
Sadržaj biogenih amina u ribi i ribljim proizvodima ovisi o vrsti ribe odnosno količini slobodnih aminokiselina koje sadrži, načinu na koji se riba obrađuje odnosno potencijalu za rast i razvoj bakterija u ribljim proizvodima te uvjetima i temperaturi skladištenja ribe. Kako sadržaj biogenih amina u hrani može biti povezan i s procesom obrade ili kontaminacije tijekom proizvodnje i neodgovarajuće pohrane, prisutnost relativno velikih količina biogenih amina u ribi ukazuje na nedostatke u lancu proizvodnje ili rukovanja.

Konzumiranje biogenih amina putem hrane u normalnim uvjetima ne predstavlja neposrednu opasnost za zdravlje, budući da ljudski organizam posjeduje nekoliko kontrolnih mehanizama za interne, ali i za amine nastale izvan organizma. U niskim su koncentracijama esencijalni za brojne fiziološke funkcije, međutim, ako se konzumiraju u velikim količinama njihova farmakološka aktivnost prelazi u toksičnost (Taylor, 1986) i predstavljaju zdravstveni rizik kod osjetljivih pojedinaca. Kod viših koncentracija biogenih amina pod određenim uvjetima može doći do zakazivanja tih kontrolnih mehanizama, što dovodi do neželjenih efekata za zdravlje organizma. Uz histamin, u toksikološkom smislu jednako su značajni i ostali biogeni amini jer pojačavaju negativno djelovanje samog histamina. Za kadaverin i putrescin utvrđeno je da potiču toksičnost histamina, no usprkos tome u istraživanjima za parametar sigurnosti i kvalitete ribe i ribljih proizvoda uzima se isključivo histamin (Bulushi i sur., 2009). Sam za sebe, histamin nije odgovarajući pokazatelj indeksa kvarenja ribe, posebice kod vrsta s visokim udjelom histidina (tuna, inćun) (Rossi i sur., 2002).

Nosić i Krešić (2015) navode kako se, iz pregleda istraživanja biogenih amina u svijetu provedenih u 2011. i 2012. godini, može zaključiti da su najčešće ispitivane namirnice upravo riblji proizvodi. Najčešće se istražuje histamin, a istraživanja se provode s različitim ciljevima. Jedan od ciljeva je definiranje povezanosti koncentracije histamina u ribi i vrsta bakterija koje ga mogu producirati, dok ostali ciljevi obuhvaćaju razvoj novih ili poboljšanje postojećih analitičkih metoda za detekciju histamina, izvješćivanje o sadržaju biogenih amina u proizvodima iz različitih država i regija te određivanje sadržaja biogenih amina u svrhu kontrole efikasnosti metoda razvijenih u pripremi, skladištenju i pakiranju hrane (Erim, 2013).

2.1.1. Histamin

Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, jedan od najproučavanijih biogenih amina je histamin (Šimat, 2010a). Histamin (β -imidazol-etilamin) u ribi se oblikuje postmortalnom bakterijskom dekarboksilacijom esencijalne aminokiseline histidina. Dekarboksilaciju histidina vrši enzim histidin-dekarboksilaza (Bogdanović i sur., 2009) (slika 2).



Slika 2. Metabolički put nastajanja histamina djelovanjem histidin – dekarboksilaze (Janči, 2016)

Inaktivacija histidin-dekarboksilaze uglavnom se odvija na temperaturi iznad 65 °C. Upravo zato koncentracija biogenih amina je 4 do 10 puta niža prilikom kuhanja nego prilikom soljenja i sušenja (Bogdanović i sur., 2009). Jednom nastao enzim histidin-dekarboksilaza može nastaviti producirati histamin u ribi i u slučaju kada bakterije nisu aktivne. Taj enzim može biti aktivan i na temperaturama konzerviranja hlađenjem, a vrlo je vjerojatno da enzim ostaje stabilan i prilikom konzerviranja smrzavanjem te da se može vrlo brzo reaktivirati nakon odmrzavanja (Nosić i Krešić, 2015).

Razine histidina variraju od 1 g kg⁻¹ u haringama do 15 g kg⁻¹ u mesu tunjevine (Nosić i Krešić, 2015), a toksični učinak histamina pojačavaju biogeni amini putrescin i kadaverin (Bogdanović i sur., 2009, Bulushi i sur., 2009, Kuley i sur., 2005, Maintz i Novak, 2007, Park i sur., 2010, Rossi i sur., 2002, Erim, 2013). Za razliku od bijele ribe (na primjer oslić) koja sadrži tek neznatne količine slobodnog histidina, inćun, bonito (tunj), haringa, mlada štika,

skuša, lokarda (*Scombridae*), srdela, papalina i tunjevina su vrste koje sadrže visoku razinu slobodnog histidina te predstavljaju i rizik za histaminsko trovanje (Nosić i Krešić, 2015).

Bakterije povezane s nastajanjem histamina uglavnom su prisutne u slanoj vodi. Prirodno su im stanište škrge i crijeva (utroba) živih riba i te bakterije ni na koji način ne ugrožavaju ribu. Međutim, nakon uginuća, obrambeni mehanizmi u organizmu ribe više ne mogu inhibirati rast bakterija te rastu bakterije koje su naročito aktivne u nastajanju i produciranju histamina (FDA, 1996). Do 2004. godine vladalo je opće mišljenje da bakterije odgovorne za histaminsko trovanje pripadaju isključivo mezofilnim bakterijama, što je izazvalo nedoumice u vezi nastanka histamina na temperaturama nižim od 7 do 10°C. Psihrofilne bakterije (*Morganella psychrotolerans* i *Photobacterium phosphoreum*) izolirane su kao proizvođači histamina u ribi skladištenoj na 0°C. Danas je jasno da i mezofilne bakterije (*Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Clostridium perfringens* i *Raoultellaplanticola*) i psihrofilne bakterije mogu proizvesti toksične koncentracije histamina i drugih biogenih amina u plodovima mora i time uzrokovati trovanje (Dalgaard i Emborg, 2009).

U znanstvenoj literaturi kao najčešći proizvođači histamina navode se vrste: *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium phosphoreum*, *Raoultella planticola* i *Hafnia alvei* (Dalgaardi sur., 2008, EFSA, 2011). Prema nekim istraživanjima najveće koncentracije histamina u ribljem mesu kontaminiranom *Morganellom morganii* postižu se kada ta bakterija dođe u stacionarnu fazu rasta. Razlike u fazama rasta mikroorganizama nastaju zbog promatranja različitih vrsta mikroorganizama koji produciraju histamin kao i različitih vrsta riba - morskih ili oceanskih (Nosić i Krešić, 2015). Stav je istraživača da bi praćenje razmnožavanja bakterije *Morganella morganii* bilo dobro implementirati u HACCP sustave tvornica ribljih proizvoda kako bi se sa sigurnošću moglo nadzirati nastajanje histamina (Nosić i Krešić, 2015).

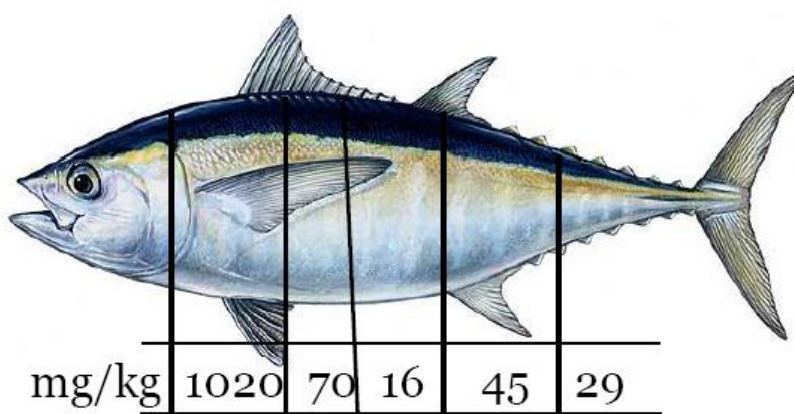
Nastanak histamina moguć je i u slučajevima kada je aktivnost mikroorganizama smanjena ili eliminirana, ukoliko je u namirnici prisutan enzim histidin-dekarboksilaza koji nije u potpunosti inaktiviran, što može biti slučaj kod smrzavanja i odmrzavanja te nedovoljne termičke obrade. Osim toga, nastanak histamina moguć je i u slučaju rekontaminacije proizvoda, na primjer nakon otvaranja konzerve, budući da prerađena riba i dalje sadrži velike količine slobodnog histidina (Janči, 2016).

Optimalna temperatura za razvoj histamina je 20 do 25 °C, ali je i pri temperaturama od +4 °C kroz 3-7 dana skladištenja zabilježen porast njegove količine u ribljem mišićju (Kankii

sur., 2004, Emborg i Dalgaard, 2006, Šimat, 2010a). Provedena istraživanja pokazala su da je optimalna temperatura za razvoj histamina 25 °C, a da rapidan rast pokazuje na temperaturi od 32,2 °C, iz čega se može zaključiti da je histamin prije rezultat nepravilnog skladištenja na povišenoj temperaturi nego dugotrajnog skladištenja na relativno nižoj temperaturi (Mendes, 2009).

Ipak, regulativa EU (EC 853/2004) zahtijeva da se svježi proizvodi ribarstva, odmrznuti neprerađeni te kuhani i rashlađeni proizvodi ribarstva, moraju održavati na temperaturi približno onoj topljenog leda (EU, 2004). Skladištenje plodova mora ispod 2 °C ili 4,4 °C, kao što traže EU i SAD-a propisi, sprječava stvaranje histamina od strane mezofilnih bakterija i smanjuje brzinu stvaranja histamina pod utjecajem psihrofilnih bakterija. Međutim, psihrofilne bakterije mogu proizvoditi toksične koncentracije histamina kod rashlađenih plodova mora na 2 °C i na 4,4 °C nakon određenog vremena skladištenja (Dalgaard i Emborg, 2009).

Histamin se odlikuje velikom termorezistencijom, a prema nekim autorima izdržava čak i temperaturu od 200 °C čime predstavlja veliki problem u industriji ribljih konzervi jer ga ne mogu uništiti temperature sterilizacije (Bogdanović i sur., 2009). K tome, histamin nije ravnomjerno raspodijeljen u neispravnoj ribi ili njezinim dijelovima (slika 3), pa svi potrošači koji su konzumirali ribu ne moraju biti otrovani histaminom jer se 50 mg kg⁻¹ može naći u jednom dijelu ribe, a više od 500 mg kg⁻¹ u drugom dijelu ribe (Lehane i Olley, 2000).



Slika 3. Raspodjela histamina u mesu ribe (Šimat, 2011)

Kada jednom nastane, histamin se ne može ukloniti niti povišenom temperaturom (zagrijavanjem, sterilizacijom) ni sniženom temperaturom (smrzavanjem) (Nosić, 2010). Ako se riba duže od 16 sati ne drži na temperaturama hlađenja (ili nižim) dolazi do nastajanja

visokih koncentracija histamina, a za vrijeme od 24 sata bakterije proizvođači histamina mogu se dovoljno razmnožiti da stvore toksičnu koncentraciju histamina (Naila i sur., 2011).

Najbolji način za sprječavanje nastajanja histamina je brzo hlađenje ribe odmah nakon ulova i stroga kontrola temperature tijekom prerade, skladištenja i distribucije ribe odnosno jedina učinkovita metoda je skladištenje ribe na temperaturi nižoj ili jednakoj 4,4 °C u svakom trenutku od ulova do potrošnje (Nosić, 2010).

Soljenje, a posebno mariniranje, značajno mogu utjecati na promjenu kemijskog sastava mesa ribe, budući da dolazi do značajnog smanjenja sadržaja vode, povećanja sadržaja masti i povećanja sadržaja pepela. Ovi postupci utječu i na smanjenje a_w vrijednosti mesa ribe, a time i na smanjenje ukupnog broja bakterija. Ipak, ovi postupci ne mogu jamčiti nisku razinu histamina kao ni ostalih biogenih amina iako je opaženo blago opadanje udjela histamina tijekom procesa zrenja slanih incuna, što je objašnjeno difuzijom histamina u salamuru (Bogdanović i sur., 2009, Koral i sur., 2013).

2.1.2. Granične vrijednosti histamina u ribi i ribljim prerađevinama

Od svih biogenih amina, histamin ima najveći utjecaj na ljudsko zdravlje, te se njegove količine u prehrambenim proizvodima obično uzimaju kao pokazatelji svježine i kvalitete. Putrescin, spermin, spemidin i kadaverin mogu još i ojačati negativne učinke histamina (Bulushi i sur., 2009), a kad reagiraju s nitritima mogu tvoriti karcenogene nitrozamine (Önal, 2007).

Histamin se rijetko nalazi u svježoj ribi, a njegov udio raste s razvojem procesa bakterijske razgradnje ribe zbog čega se histamin može smatrati indikatorom kvarenja ribe. Na histaminsko trovanje ribom otpada 5% svih oboljenja vezanih za hranu kao i 37% svih bolesti vezanih za ribu podrijetlom iz mora ili oceana. Ova vrsta trovanja ribom ujedno je i najčešća u svijetu, a najviše slučajeva trovanja zabilježeno u SAD-u, Japanu i Ujedinjenom Kraljevstvu (Nosić i Krešić, 2015).

Trovanje histaminom uključuje široki spektar simptoma ovisno o količini unesenog histamina, osjetljivosti organizma konzumenta i drugim parametrima, a simptomi se obično javljaju 10 minuta do 1 h nakon konzumacije namirnica bogatih histaminom. Dalgaard i sur. (2008) navode kako je tijekom devedesetih godina XX. stoljeća trovanje histaminom bilo zaslužno za 32% svih trovanja povezanih s konzumacijom proizvoda ribarstva čime zauzima prvo mjesto na listi problema sa zdravstvenom ispravnosti proizvoda ribarstva, dok je u

državama u razvoju stvarni broj vjerojatno mnogo veći od dokumentiranog broja incidenata (Vidaček, 2014).

Histamin je jedini biogeni amin s regulatornim granicama određenim europskim zakonodavstvom, a istim je kao referentna analitička metoda određena metoda visoko učinkovite tekućinske kromatografije (HPLC). Prema Uredbi Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Službeni list Europske unije, 2005), proizvodi od ribljih vrsta koje sadrže visoke koncentracije slobodnog histidina (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae*) i za devet uzoraka po šarži moraju udovoljavati sljedećim uvjetima:

1. Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina $\leq 100 \text{ mg kg}^{-1}$
2. Maksimalno 2 uzorka smiju imati vrijednost sadržaja histamina između 100 i 200 mg kg^{-1}
3. Niti jedan uzorak ne smije imati ustanovljenu vrijednost $\geq 200 \text{ mg kg}^{-1}$.

Proizvodi ribarstva obrađeni enzimskim dozrijevanjem u salamuri, proizvedeni od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina za devet uzoraka po šarži moraju udovoljavati sljedećim uvjetima:

1. Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina $\leq 200 \text{ mg kg}^{-1}$
2. Maksimalno 2 uzorka smiju imati vrijednost sadržaja histamina između 200 i 400 mg kg^{-1}
3. Niti jedan uzorak ne smije imati ustanovljenu vrijednost $\geq 400 \text{ mg kg}^{-1}$.

EU regulativa nema određene granične vrijednosti za ostale biogene amine, a iako su povezane s histaminskim trovanjem pravilnicima nisu obuhvaćene porodice riba *Belonidae*, *Gempylidae*, *Istiophoridae* i *Xiphiidae*.

Zakonska regulativa na području SAD-a stroža je te dopušta maksimalnu količinu od 50 mg kg^{-1} histamina, pri čemu se dodatno preporuča primjena znanstvenih podataka za procjenu svježine ribe kao što je prisutnost drugih biogenih amina povezanih s kvarenjem ribe (FDA, 2011).

U Republici Hrvatskoj dozvoljeni maseni udio histamina u ribi i proizvodima od ribe propisan je Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu, Prilogom I. Mikrobiološki kriteriji za hranu, Poglavlje 1. Kriteriji sigurnosti (NN, 2008). Točke 1.26 i 1.27 Pravilnika posebno se odnose na riblje vrste porodica: *Scombridae* (skuša, tuna), *Clupeidae* (srdele), *Engraulidae* (inćun), *Coryphaenidae* (dupin), *Pomatomidae*, *Scombresosidae*. Granične vrijednosti koje se

odnose na proizvode ribarstva od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina, i proizvode ribarstva obrađene enzimskim dozrijevanjem u salamuri proizvedene od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina, usuglašene su s vrijednostima Uredbe Komisije.

Referentna metoda izabrana od strane Europske komisije za separaciju i kvantifikaciju većeg broja biogenih amina je HPLC metoda u kombinaciji s pred-kolonskom ili postkolonskom derivatizacijom koristeći dansil klorid kao derivatizacijski reagens (Malle i sur.,1996).

2.2. METODE ZA ODREĐIVANJE HISTAMINA U RIBI

Iako je senzorna ocjena (izgled, boja, okus, miris i tekstura) koristan alat kontrole svježine i kvalitete ribe i ribljih proizvoda, sadržaj histamina ne može se lako detektirati na temelju mirisa ili izgleda jer, ponekad, visoke razine histamina ne prate nikakvi znaci kvarenja. Do sada je razvijen veliki broj analitičkih metoda za određivanje histamina (tablica 1) koje se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima. Svaka od tih metoda ima neke prednosti, ali i nedostatke koji otežavaju njezinu primjenu u industriji.

Tablica 1. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (FAO/WHO, 2013)

	AOAC metoda	HPLC metode	Spektrofluorometrijske metode	ELISA	Kolorimetrijske metode
Vrijeme potrebno za 1 test (h)	1-2	1-2	1	1	1
Oprema	Fluorometar	HPLC	Spektrofluorometar	Spektrofotometar	Spektrofotometar
Prag kvantifikacije	1 – 5 ppm	1.5 – 5 ppm	1.5 ppb	2 – 5 ppm	20 ppm
Raspon	1 – 150 ppm	5 – 2500 ppm	1.5 ppb – 100 ppm	0 – 500 ppm	0.8 – 300 ppm
Prednosti metode	Robusnost, ponovljivost, točnost, preciznost	Analiza svih biogenih amina, točnost, preciznost	Točnost, preciznost, cijena	Jednostavnost (kit), cijena, više testova istovremeno	Jednostavnost, cijena, više testova istovremeno, jednostavna kalibracija

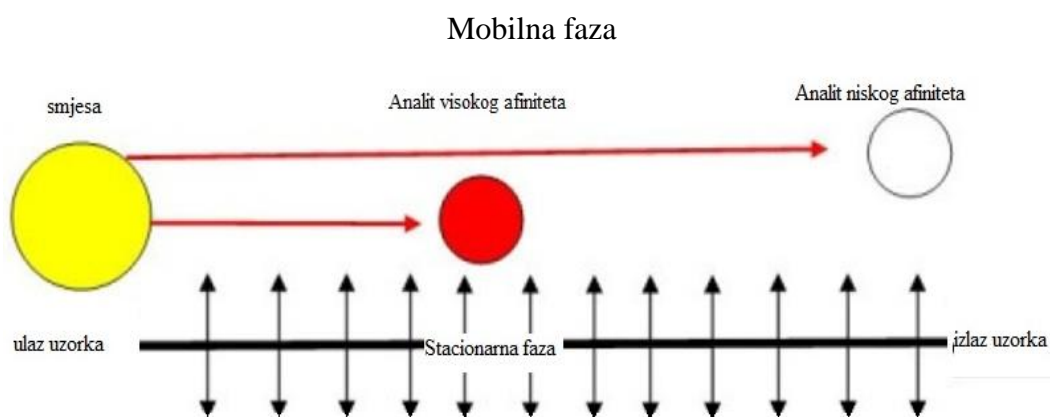
Kromatografske metode služe za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u složenim smjesama. Zajedničko im je postojanje nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Uobičajeno se nazivaju prema sastavu pokretne faze pa se govori o plinskoj i tekućinskoj kromatografiji te o fluidnoj kromatografiji u superkritičnim uvjetima. Najširu primjenu imaju tankoslojna kromatografija (TLC - *Thin*

layer chromatography), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC - *High-pressure liquid chromatography*) i kombinirana tehnika plinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS). Prednosti ovih laboratorijskih metoda su robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost, no njihova je primjena uglavnom ograničena na analitičke laboratorije (u znanstvene ili regulatorne svrhe) jer često zahtijevaju složenu i dugotrajnu pripremu uzoraka te nije moguće u realnom vremenu analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe. Također, zahtijevaju upotrebu izrazito skupih analitičkih instrumenta te posebno educirano osoblje za provođenje analiza zbog čega su teško primjenjive u industrijskim uvjetima.

Kako bi se olakšala kontrola sadržaja histamina u industriji, razvijeno je nekoliko brzih metoda za određivanje histamina koje su uglavnom bazirane na različitim enzimatskim metodama (ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Nedostatak im je smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenima soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, kao i činjenica da također zahtijevaju različite postupke pripreme uzoraka, a iako su kitovi prijenosni, nisu prikladni za analize izvan laboratorija (Janči, 2016).

2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija predstavlja metodu odjeljivanja u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze (veličine 3-10 μm) noseći sastavnice uzorka za analizu. Molekule uzorka putuju tako niz kolonu, pri čemu se uspostavlja ravnoteža između mobilne i stacionarne faze (slika 4). Može se podijeliti na: a) adsorpcijsku kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza adsorbens i b) razdjelnu kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza kapljevinna nanosena na čvrsti inertni nosač.

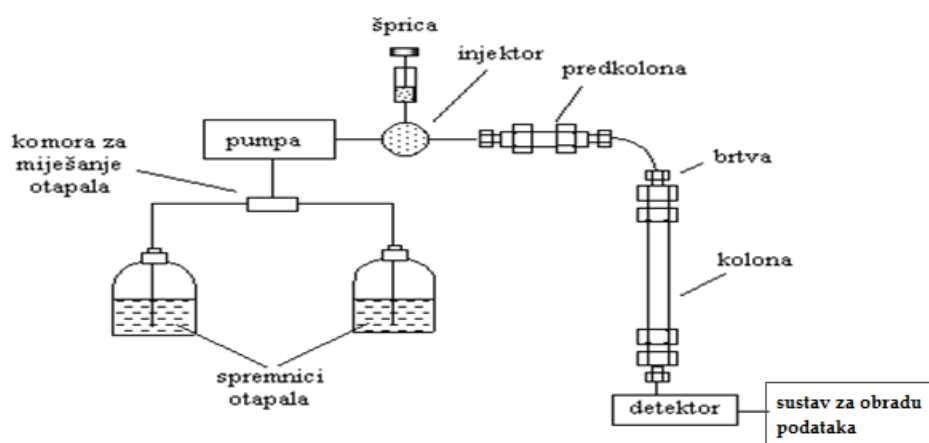


Slika 4. Grafički prikaz kromatografske tehnike (Lalić, 2013)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) najčešće je primjenjivana metoda za analizu histamina pri kojoj se histamin ekstrahira iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega je potrebno provesti derivatizaciju (reakcija s reagensom) pri čemu nastaje kompleks koji ima izraženu apsorpciju svjetlosti u UV dijelu spektra koji se nakon separacije na kromatografskoj koloni može detektirati pomoću DAD ili UV detektora. U ovu skupinu metoda spada i metoda koju su razvili Malle i sur. (1996), a uredba EZ 2073/2005 navodi jukao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva. Budući da se njom mogu separirati, identificirati i kvantificirati spojevi prisutni u tragovima (ppt) u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u tekućini, a jednostavna je za rukovanje, ova je metoda našla široku primjenu te je najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina.

HPLC metoda koristi se tekućom mobilnom fazom koja djeluje kao nosač za tekući uzorak. Injektirani uzorak prolazi kroz stacionarnu fazu uz povišeni tlak koji dodatno povećava efikasnost odvajanja. Uzorak se unosi u tok mobilne faze te dolazi do razdvajanja smjese na sastavne komponente koji se zadržavaju u koloni i na temelju vremena zadržavanja (vremena potrebnog da pojedina komponenta prođe kroz kolonu) identificira se pojedina komponenta. Vrijeme zadržavanja (*retention time*, R_t) ovisi o prirodi komponente koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze.

HPLC sustav čine spremnik mobilne faze (otapala), crpka, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor i računalo (slika 5).

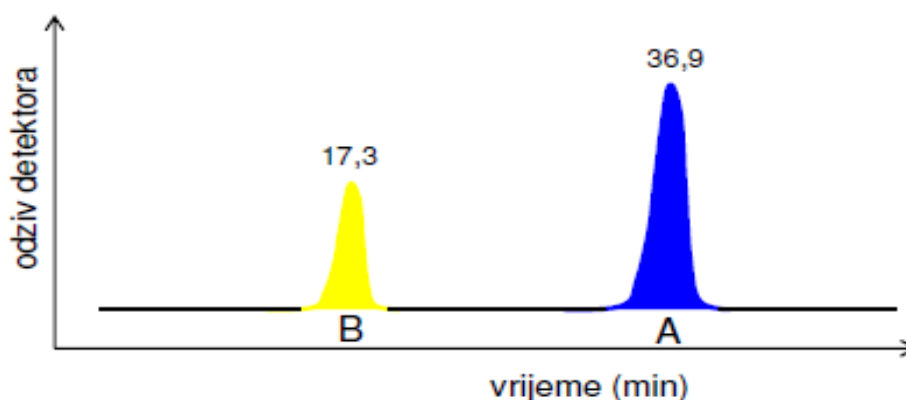


Slika 5. Shematski prikaz HPLC uređaja (Luterotti, 2009)

Uz spremnik mobilne faze može se nalaziti i sustav za otplinjavanje u kojem se otopljeni plinovi uklanjaju iz otapala, nošeni inertnim plinom. Razlog tome je što plinovi, zbog stvaranja mjehurića, mogu prouzročiti širenje zone eluiranih sastojaka i ometati rad detektora. Razdvajanje supstanci može se provoditi izokratnom ili gradijetnom eluacijom. Često se bolji

kromatogram dobiva gradijetnom eluacijom nego izokratnom pri kojoj se koristi samo jedno otapalo. Kod gradijetne elucije koriste se dva ili više otapala različite polarnosti te se pritom odnos njihove zapremine mijenja na unaprijed utvrđen način. Pumpa u HPLC sustavu služi za stvaranje i mjerenje specifične brzine potoka. U HPLC sustavima najčešće se koriste recipročne pumpe koje se sastoje od cilindrične komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa, čime se stvara pulsirajući protok. Uzorak se u kolonu unosi protokom mobilne faze preko sustava za unošenje uzorka kojeg obično čini plinski ventil s više izmjenjivih petlji. Kolone su najčešće izrađene od čeličnih ili staklenih cijevi koje su punjene zrcima punila promjera od 3-10 μm . Kao punilo najčešće se upotrebljava silikagel, ali se u tu svrhu koriste i glinica, porozni polimeri i ionski izmjenjivači. Dimenzije HPLC kolona kreću se između 20 mm i 500 mm duljine i 1-100 mm unutarnjeg promjera. Nakon što uzorak nošen mobilnom fazom prođe kroz kolonu, dolazi do detektorskog sustava koji u HPLC-u nije univerzalan, već se ovisno o prirodi uzorka i svojstvima analiziranog spoja koriste UV, fluorescentni ili ELSD detektor. Detektor je spojen s računalom koje prima električni signal i bilježi ga u obliku kromatograma (Skoog i sur., 1999).

Rezultat provedene HPLC analize predstavlja kromatogram, niz simetričnih elucijskih krivulja odnosno pikova koji nastaju nakon prolaska analita kroz kolonu i detektor odnosno kromatogram je grafički prikaz odziva detektora, koncentracije analita u eluatu ili druge veličine koja se koristi kao mjera koncentracije eluata prema volumenu eluata ili vremenu (slika 6).



Slika 6. Kromatogram: stacionarna faza jače veže sastojak A te sastojak B brže putuje i stoga ima kraće vrijeme zadržavanja (Lalić, 2013)

Odziv detektora, ovisan o koncentraciji sastojka u uzorku, bilježi se kao funkcija vremena zadržavanja čime se na kromatogramu dobivaju pikovi različite površine, odnosno, visine i

položaja na vremenskoj osi. Svaki pik predstavlja odziv detektora za drugačiji spoj. Položaj pika na vremenskoj osi služi za identifikaciju sastojka, odnosno, dokazivanje kvalitativnog sastava uzorka, dok se na temelju površine ispod pika ili njegove visine dobiva kvantitativna procjena sastojka u uzorku (Skoog i sur., 1999).

Kvantitativna analiza provodi se metodom kalibracije s vanjskim (eksternim) ili unutarnjim (internim) standardom. U svrhu kalibracije pripravi se niz poredbenih otopina poznatih koncentracija u očekivanom rasponu. Standardima se snime kromatogrami i površine (ili visine) pikova prikažu se u ovisnosti o koncentraciji. Tako se dobije kalibracijski pravac (krivulja) koji je temelj za kvantitativnu analizu.

2.2.2. Raman spektroskopija

U analizi kvalitete i sigurnosti hrane u posljednje vrijeme izražen je velik interes za primjenu brzih, neinvazivnih metoda poput Raman spektroskopije. Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule (Long, 2002, Ferraro, 2003) odnosno pomaku u valnoj duljini ili frekvenciji raspršene zrake svjetlosti koji je posljedica neelastičnog raspršivanja prilikom interakcije fotona i molekula ispitivane tvari. Snimanjem intenziteta raspršene svjetlosti u odnosu na valnu duljinu ili frekvenciju dobiva se Ramanov spektar koji je karakterističan za određenu molekulu.

Ramanova spektroskopija pruža mogućnost brze analize uzoraka u svim agregatnim stanjima uz minimalnu pripremu uzorka. Glavno ograničenje kod široke primjene ove metode, prije svega je činjenica da je Ramanovo raspršenje efekt slabog intenziteta te zahtijeva relativno visoku koncentraciju analita u uzorku ili veliku snagu izvora svjetlosti kako bi se signal mogao detektirati. Rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS) i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) specifične su tehnike koje se koriste za povećanje intenzita signala odnosno osjetljivosti Ramanove spektroskopije (Mathies, 1995).

Visoka osjetljivost metode, odnosno pojačanje signala od 10^3 do 10^7 puta može se postići korištenjem površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS) do kojeg dolazi kada je ispitivana molekula adsorbirana na ili se nalazi u neposrednoj blizini površine metalne nanočestice – SERS supstrata. Za izradu SERS supstrata najčešće se koriste zlato, srebro i bakar koji se različitim postupcima nanose na krute nosače ili prevode u agregate koloidnih čestica za mjerenja u otopinama.

2.2.2.1. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS)

Za povećanje osjetljivosti Ramanove spektroskopije koriste se specifične tehnike poput spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS). Osim izrazitog pojačanja Ramanovog raspršenja, dodatna prednost SERS spektroskopije je i eliminacija fluorescencije uslijed prijenosa energije s molekule na metal (Janči, 2016) što ju čini gotovo idealnom tehnikom za istraživanje i analizu različitih kemijskih i bioloških uzoraka. Općenito je prihvaćeno da su za pojačanje Ramanovog raspršenja u SERS efektu odgovorna dva mehanizma: a) mehanizam elektromagnetskog pojačanja, kod kojeg je električno polje koje osjeća adsorbirana molekula u blizini metalne površine znatno snažnije nego što bi bilo bez metalne površine, i b) kemijsko (ili elektronsko) pojačanje uslijed promjene polarizabilnosti zbog interakcije adsorbirane molekule i metalne površine (Mikac, 2016).

Mehanizam elektromagnetskog pojačanja uglavnom se zasniva na pojačanju elektromagnetskog polja u blizini metalne površine zbog površinske plazmonske rezonancije (Mikac, 2016). Male metalne čestice ili nanostrukturirana površina polariziraju se upadnim oscilirajućim elektromagnetskim valom svjetlosti. Uslijed toga vodljivi elektroni na metalnoj površini kolektivno osciliraju stvarajući površinski plazmon. Lokalizirani površinski plazmon omogućava rezonantnoj valnoj duljini da se apsorbira i rasprši nametalu, stvarajući pritom snažno elektromagnetsko polje oko metalne čestice ili nanostrukturirane površine (Mikac, 2016). Ovo jako elektromagnetsko polje inducira dipol u obližnjim molekulama te na taj način povećava Ramanovo raspršenje na adsorbiranim molekulama. Elektromagnetsko pojačanje je dalekosežan efekt i neosjetljiv je na kemijsku prirodu molekule koja se želi analizirati. Veličina pojačanja ovisi o materijalu od kojeg je napravljen supstrat, ali i o veličini i obliku struktura, kao i o valnoj duljini korištenoj za pobudu. Tako su za valne duljine pobude iz vidljivog dijela spektra, metali Ag, Au i Cu, kao i alkalijski metali vrlo dobri materijali za SERS supstrate. Al i In daju dobra pojačanja u širokom dijelu spektra, od infracrvenog do ultraljubičastog, dok Ga daje mjerljiva pojačanja samo u IR području (Mikac, 2016).

Kemijski mehanizam ili mehanizam prijenosa naboja smatra se efektom „prvog sloja“ jer je kratkog dosega (0,1-0,5 nm) te zahtijeva da molekule budu adsorbirane direktno na površinu metala. Prilikom interakcije molekule koja se adsorbira i metalne površine dolazi do promjene polarizabilnosti molekule uslijed prijenosa naboja, σ ili π vezanja na metal ili interakcije putem atoma adsorbiranih na metalnu površinu (Janči, 2016).

Janči (2016) navodi kako kemijski mehanizam objašnjava razlike u relativnim intenzitetima i položajima SERS vrpce u odnosu na vrpce u normalnom Ramanovom spektru, razlike u teorijskim i eksperimentalnim faktorima pojačanja te pojavu novih vrpce u SERS spektru što nije rijedak slučaj prilikom snimanja SERS spektara te kako se općenito smatra da kemijski mehanizam doprinosi ukupnom faktoru pojačanja za $10\text{-}10^3$ puta.

Općenito, SERS supstrat je bilo koja metalna nanostruktura koja omogućuje površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja, a usporedno s razvojem SERS spektroskopije razvijale su se i različite tehnike pripreme pogodnih metalnih SERS supstrata. SERS supstrati mogu se podijeliti u tri skupine: (1) suspenzije metalnih nanočestica, (2) metalne nanočestice imobilizirane na čvrstim supstratima i (3) nanostrukture proizvedene izravno na čvrstim podlogama (Mikac, 2016).

Suspenzije metalnih nanočestica pojavile su se ubrzo nakon otkrića SERS efekta na srebrnoj elektrodi te su do danas najčešće korišteni i najbolje istraženi SERS supstrati. Razlog tome je prije svega jednostavnost njihove pripreme uz relativno niske troškove i jednostavnu opremu zbog čega su dostupni gotovo svakom laboratoriju, dobar faktor pojačanja te stabilnost. Koloidne suspenzije metalnih nanočestica jednostavno se sintetiziraju redukcijom metalnih soli u otopini uz dodatak redukcijskog i stabilizacijskog sredstva. Redukcijom metalnih soli nastaju metalne nanočestice metala različitih oblika i dimenzija ovisno o uvjetima i metodi pripreme. Sintetizirane nanočestice imat će različito područje plazmonske rezonancije, ovisno o veličini, obliku i dielektričnim svojstvima korištenog metala. Za sintezu srebrnih koloida najčešće se koristi redukcija srebrovog nitrata ili sulfata, dok su za sintezu zlatnih koloida najčešće korišteni vodikov ili kalijev tetrakloraurat. Kao redukcijska sredstva za pripremu ovih koloida uglavnom se koriste natrijev citrat i natrijev borhidrid. Uz redukcijsko sredstvo u reakcijsku smjesu dodaju se i različita stabilizirajuća sredstva čija je uloga elektrostatska ili sterička stabilizacija koloidne otopine odnosno sprječavanje agregacije i sedimentacije koloidnih nanočestica tijekom skladištenja (Janči, 2016).

Za uspješnu kvantitativnu SERS analizu ključno je razviti pouzdan kalibracijski model. Kao i kod drugih analitičkih metoda, potrebno je pripremiti kalibracijske uzorke s odgovarajućim koncentracijama ciljanog analita te snimiti njihove spektre. Budući da SERS spektar sadrži veliku količinu informacija o promatranom uzorku (u spektru su vidljive vrpce svih tvari koje u uvjetima eksperimenta daju pojačano raspršenje), karakteristike spektra otopine čistog standarda mogu se značajno razlikovati od spektra uzorka s jednakom koncentracijom standarda. Kako bi se umanjio utjecaj matriksa u kojem se nalazi ciljani

analit, poželjno je da se kalibracijski uzorci pripreme metodom dodavanja standarda direktno u uzorak s poznatom koncentracijom analita. Najjednostavniji postupak kalibracije podrazumijeva odabir karakteristične SERS vrpce analita koja je po mogućnosti dobro razdvojena od ostalih SERS vrpce u spektru uzorka te definiranje njihovog odnosa, ovisno o rasponu koncentracije, linearnom regresijom ili prilagođavanjem Langmuirove adsorpcijske izoterme eksperimentalno dobivenim podacima. Ograničavajući faktori su optimizacija parametara pripreme uzorka i samog mjerenja, točno određeni supstrati koji su prilagođeni ciljanom analitu te osiguravaju visoku osjetljivost i ponovljivost mjerenja i smanjenje interferencija drugih komponenti u uzorku.

2.2.3. Primjena Raman spektroskopije u određivanju histamina

Mogućnost primjene Ramanove spektroskopije za detekciju različitih spojeva u mesu ribe, između ostalog i histamina, predmet je istraživanja koje je proveo Janči (2016). Istraživanje je obuhvatilo četiri faze - od sinteze različitih tipova SERS supstrata i analiza na analitičkom standardu histamina uz optimizirane parametre mjerenja preko ispitivanja SERS supstrata i mjerenja na uzorcima ribe uz dodatak histamina, pri čemu je razvijeno nekoliko postupaka pripreme uzorka koji omogućuju snimanje SERS spektra histamina u ekstraktima ribljeg mišićja, do završne faze istraživanja koja je provedena na realnim uzorcima ribe u kojima se histamin formirao prirodnim putem.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovaj rad proveden je u sklopu istraživanja mogućnosti primjene Raman spektroskopije u analizi udjela histamina u ribi i ribljim proizvodima. Cilj rada je usporedba dobivenih rezultata na mariniranoj ribi s rezultatima analitičke referentne HPLC metode.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Uzorci ribe

Na tržištu su nabavljeni uzorci mariniranog incuna (Arbacommerce, Hrvatska) i doneseni u laboratorij. Uzorci su podijeljeni u sedam skupina te je prva skupina uzoraka za analize pripremljena odmah po dopremanju u laboratorij, a ostalih šest ostavljeno je na sobnoj temperaturi tijekom 6, 12, 18, 24, 30 i 36 sati kako bi došlo do prirodnog formiranja histamina. Pripremljeni uzorci analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) te SERS metodom.

3.2.3. Reagensi

- Otopina dansil-klorida (50 mg dansil-klorida otopi se u 10 ml acetona, svježa) (Acros organics, New Jersey, USA)
- Stock otopina histamina (82 mg histamin-dihidroklorida otopi se u 100 ml vode; 82,8 mg histamin dihidroklorida je ekvivalent 50 mg histamina) (Sigma chemical Co., Saint Louise, SAD)
- Interni standard (50 mg imidazola i 1,7-diaminoheptana otopi se u 10 ml vode) (Acros organics, New Jersey, USA)
- Otopina L-prolina (1 g L-prolina otopi se u 100 ml vode) (Acros organics, New Jersey, USA)
- Perkloratna kiselina 0,4 mol/l (u odmjernu tikvicu od 500 ml pipetira se 17,2 ml 70% HClO₄ te dopuni vodom do oznake) (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Zasićena otopina Na₂CO₃ (16 g Na₂CO₃ otopi se u 50 ml vode) (Gram-mol, Hrvatska)
- Srebrov nitrat (AgNO₃, 99,9%) (Kemika, Hrvatska)
- Trinatrijev citrat dihidrat (Na₃C₆H₅O₇ x 2H₂O, 99,0%) (Kemika, Hrvatska)

- Natrijev hidroksid (NaOH, 98,0%)
- 1-butanol (C₄H₉OH, 99,5%) (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev klorid (NaCl, 99,0%) (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev borohidrid (NaBH₄, 99,0%) (Carlo Erba, Francuska).

Sve korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. U svim pokusima korištena je deionizirana voda otpornosti 18 MΩcm.

3.2.4. Laboratorijska oprema

Laboratorijsko posude:

- plastične kivete (Hrvatska)
- propipetor (Brand, Njemačka)
- mikropipetori od 100 – 1000 µL (Brand, Njemačka)
- plastične vial
- odmjerne tikvice 50 mL (Hrvatska)
- laboratorijske čašice (Hrvatska)
- staklene bočice (vial) za HPLC – 20mL (Agilent, Njemačka)
- staklena pipeta (Hrvatska)
- filter papir, Whatman nr.4.

Laboratorijski uređaji:

- Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany) uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)
- Horiba Jobin Yvon T640000 Ramanov spektrometar (Horiba Scientific, Francuska)
- homogenizator Ultra turax T-18 (IKA-Labortechnik, Njemačka)
- analitička vaga (Kern, Njemačka)
- Laboratorijska centrifuga ROTINA 380R (Hettich, Njemačka).

3.3. METODE RADA

3.3.1. Određivanje histamina HPLC metodom

Određivanje biogenog amina histamina provedeno je po metodi Malle i sur., 1996.

Priprema otopine standarda. Za pripremu otopine standarda korišten je standard histamin-dihidroklorid. Odvagane su određene mase standarda u odmjernu tikvicu od 100 ml i

otopljene u vodi. Razrjeđivanjem stock otopine dobivene su koncentracije standarda ekvivalentne koncentraciji od 0, 10, 50, 100, 200, 600 i 1000 mg kg⁻¹ uzorka. U svaki uzorak dodan je interni standard, a dobiveni rezultati korišteni su za konstrukciju baždarnog pravca.

Priprema uzorka. U kivetu je odvagano 2,5 g uzorka, dodano je 250 µl otopine internog standard i homogenizirano s 15 ml 0,4 M HClO₄ na Ultra Turax-u 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenizirani uzorak preliven je u odmjernu tikvicu od 50 ml, koja je dopunjena do oznake s HClO₄ i promiješana. Uzorak je vraćen nazad u kivetu i centrifugiran na 3500 x g kroz 3 min. Zatim je otpipetirano 100 µl supernatanta kojem je dodano 200 µl zasićene otopine Na₂CO₃ i 500 µl otopine dansil-klorida. Nakon miješanja na Vortex tresilici ovako pripremljen uzorak ostavljen je da preko noći odstoji u mraku. Idući dan u uzorak je dodano 100 µl otopine L-prolina, a nakon ponovnog miješanja na Vortexu uzorak je ostavljen da odstoji još 30 min u mraku. Po isteku 30 min dodano je 500 µl toluena te je uzorak promiješan na Vortexu i ostavljen da se odvoje slojevi. Iz gornjeg sloja uzeto je 200 µl, prebačeno u vialku i upareno u struji dušika do suhog. Suhi uzorak otopljen je u 200 µl acetonitrila, dobro promiješan te prebačen u insert za vialku i stavljen u HPLC instrument.

Provjera baždarnog dijagrama provedena je pomoću otopina B1, B2, B3i slijepe probe. Pripremljene otopine tretirane su na isti način kao i uzorci; 100 µl otopine + 200 µl Na₂CO₃ + 500 µl dansyl-klorida promiješano je na Vortexu i ostavljeno u mraku preko noći.

Otopina B1: pipetirano je 200 µl stock otopine histamina i 1 ml otopine internog standarda u odmjernu tikvicu od 100 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Otopina B2: pipetirano je 2 ml stock otopine histamina i 1 ml otopine internog standarda tikvicu od 100 mL i dopunjeno vodom do oznake.

Otopina B3: pipetirano je 2 ml stock otopine histamina i 500 µl otopine internog standarda tikvicu od 50 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Slijepa proba: pipetirano je 50 µl otopine internog standarda i dopunjeno do 5 ml sa HClO₄.

Prilikom analize uzoraka pripremljen je još jedan uzorak više i u njega je dodano 2 ml stock otopine histamina te je nakon analize izračunat stupanj iskorištenja (*recovery*) koji treba biti u granicama R% = 80-120%.

Priprema mobilne faze. Za pripremu mobilne faze korišten je acetonitril i destilirana voda. Kod mobilne faze A acetonitril i destilirana voda miješani su u omjeru 60:40, a kod mobilne faze B korišten je čisti acetonitril. Prije upotrebe kao mobilne faze za HPLC, otopina je deaerirana u ultrazvučnoj kupelji tijekom 20 minuta. Molekule zraka uklonjene su kako ne bi dospjele u kolonu te izazvale oštećenje kolone i nemogućnost očitavanja samih rezultata.

Kromatografski uvjeti. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) koristeći HPLC sustav Agilent 1100 Series LC pod sljedećim uvjetima:

Stacionarna faza kolona Zorbax ODS (C18), 5 µm (250 x 4,6 mm I.D.)

Mobilne faza A - voda: acetonitril 40:60 (v:v)

B - acetonitril

Eluiranje gradijentno

Gradijent

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0	100	0
6	62,5	37,5
8	62,5	37,5
13	12,5	87,5
20	12,5	87,5
20,01	100	0
30	100	0

Protok 1ml/min

Detektor DAD, wavelenght 254 nm, Ref. Value 550 nm, Bw 80 nm

Temperatura kolone 25 °C

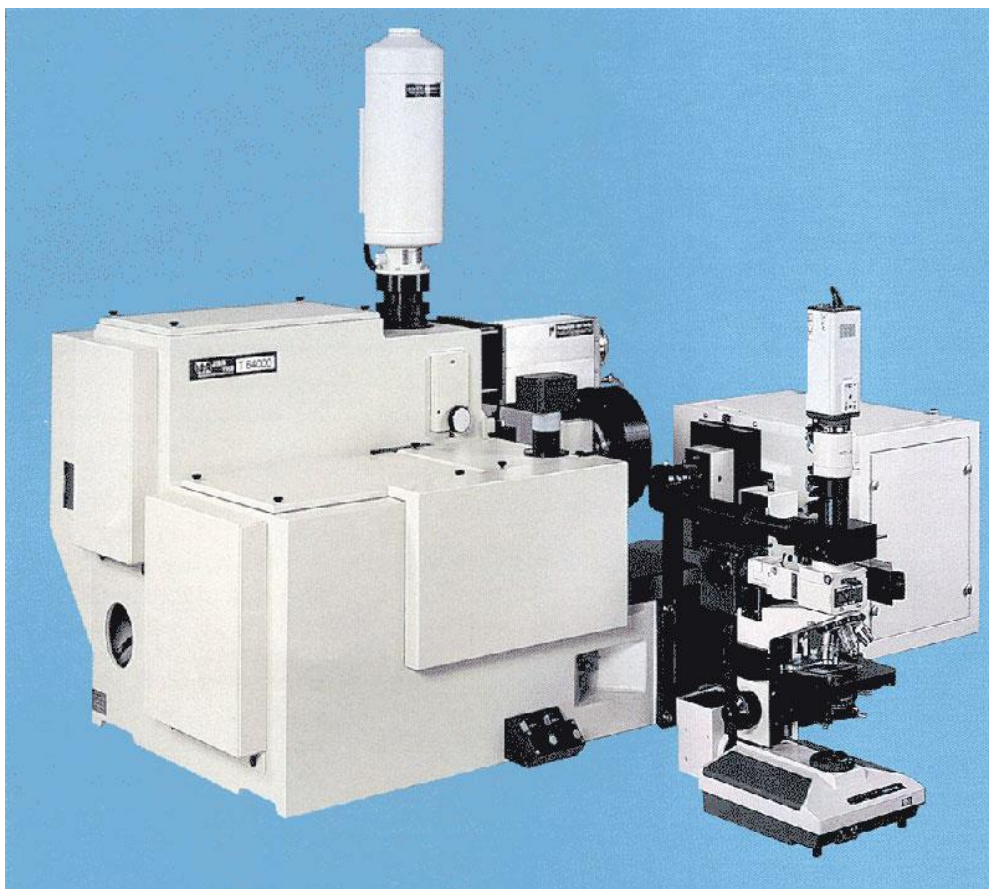
Injektirani volumen 20 µl

3.3.2. Određivanje histamina Raman spektroskopijom

Određivanje histamina Raman spektroskopijom provedeno je prema Janči i sur., 2016.

Priprema uzorka: 5 grama uzorka odvagano je u plastičnu kivetu, dodano je 20 ml 0.4 M HClO₄ te je sve dobro homogenizirano na Ultraturax-u 2 min na maksimalnoj brzini. Smjesa je zatim prebačena u odmjernu tikvicu od 50 ml, dopunjena do oznake perkloratnom kiselinom i vraćena nazad u plastičnu kivetu. Uslijedila je filtracija preko filter papira. Dva ml filtrata otpipetirano je u staklenu epruvetu u koju je prethodno odvagano 1,4 g NaCl, a zatim je dodano 0,4 ml 5M NaOH i 2 ml 1-butanola. Staklene epruvete stavljene su na tresilicu na 70 rpm/10 min. Nakon odvajanja slojeva, iz gornjeg sloja otpipetirano je 100 µl u plastičnu vialu te upareno do suhog u struji dušika. Dobiveni suhi uzorak ponovno je otopljen u 80 µl AGC koloida (srebrne nanočestice dobivene redukcijom srebrova nitrata s trinatrijevim citratom prema izmijenjenom Lee-Meislovom postupku, 1982.), 10 µl destilirane vode i 10 µl agregirajućeg sredstva (0,23 mol/L NaBH₄). Nakon miješanja, a prije same SERS analize, uzorci su stajali 4 minute.

SERS spektri uzoraka snimani su u području $1050 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ s vremenom ekspozicije 30 s u razmaku od 1 min tijekom prvih 6 min do završetka miješanja svih komponenti na Ramanov spektrometru (slika 7).



Slika 7. Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanov spektrometar (Anonymus, 2016)

Interpretacija i upotreba SERS spektra može biti vrlo složena, posebice za kvantitativne analize budući da snimljeni SERS spektri uz signale analita, sadrže i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, šuma, fluorescencije te pozadinskog signala samog detektora. Nadalje, apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisi o brojnim parametrima čija je kontrola često zahtjevna tijekom eksperimenta, a to su primjerice oscilacije lasera. Kako bi se navedeni utjecali eliminirali, provedena je optimizacija parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma te normalizaciju spektra.

3.3.3. Usporedba HPLC i SERS metode

Sva mjerenja udjela histamina u uzorcima obavljena su višestruko (za HPLC u duplikatu, za SERS u četiri mjerenja), te je svaki uzorak izračunata srednja vrijednost, standardna devijacija i odstupanje od standardne devijacije.

Usporedba metoda izvršena je na način da je HPLC metoda promatrana kao referentna, odnosno njom dobivene vrijednosti histamina uzete su kao 100% točne. S ciljem usporedbe metoda određeni su i analizirani parametri preciznost i točnost. Kod analize preciznosti uspoređene su vrijednosti standardnog odstupanja (SD) i relativnog standardnog odstupanja (RSD) uspoređivanih vrijednosti. Točnost metode procijenjena je kroz izračun postotaka iskoristivosti, odnosno analitički prinos (engl. *recovery*) koji pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. U ovom istraživanju analitički prinos izračunat je kao omjer srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija i srednjih vrijednosti koncentracija dobivenih referentnom HPLC metodom koja je uzeta kao 100% točna. Analitički prinos izražen je u postotku.

Također, izvršena je usporedba samog tijeka i vremenskog trajanja postupaka analize referentom HPLC metodom i SERS metodom.

Dobiveni rezultati prikazani su u nastavku rada.

4. REZULTATI I RASPRAVA

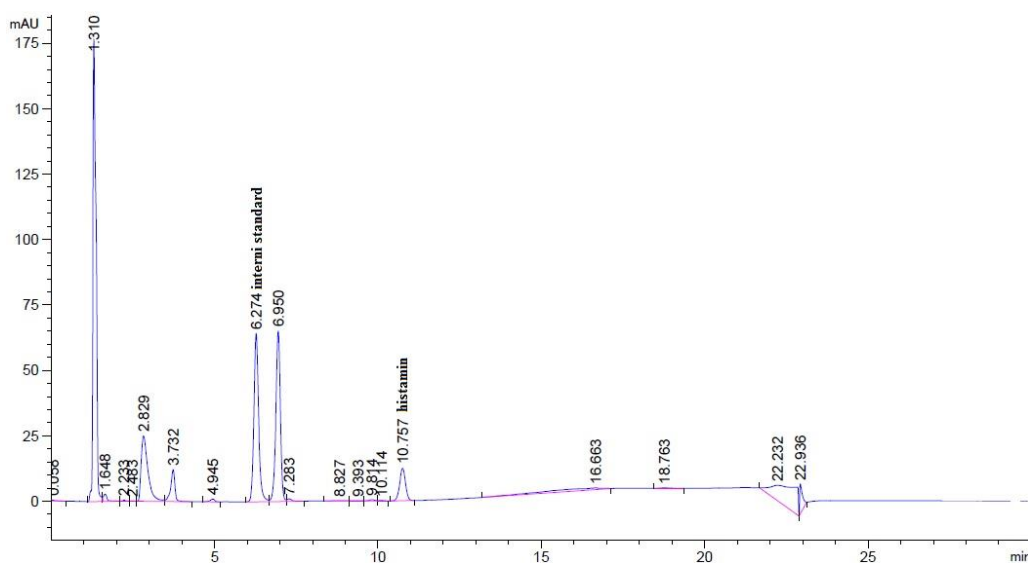
4.1. REZULTATI

Provedena je HPLC i SERS analiza baždarnih uzoraka i realnih uzoraka marinirane ribe (uzorci ribe u kojima se histamin formirao prirodnim putem). Dobiveni rezultati obrađeni su u MS Excel programu te su konstruirani baždarni dijagrami za HPLC i SERS analizu prema mjerenjima baždarnih uzoraka, a rezultati mjerenja realnih uzoraka uspoređeni su na način da se HPLC metoda uzima kao referentna, odnosno dobivene vrijednosti su 100% točne.

4.1.1. Udjel histamina kvantificiran HPLC metodom

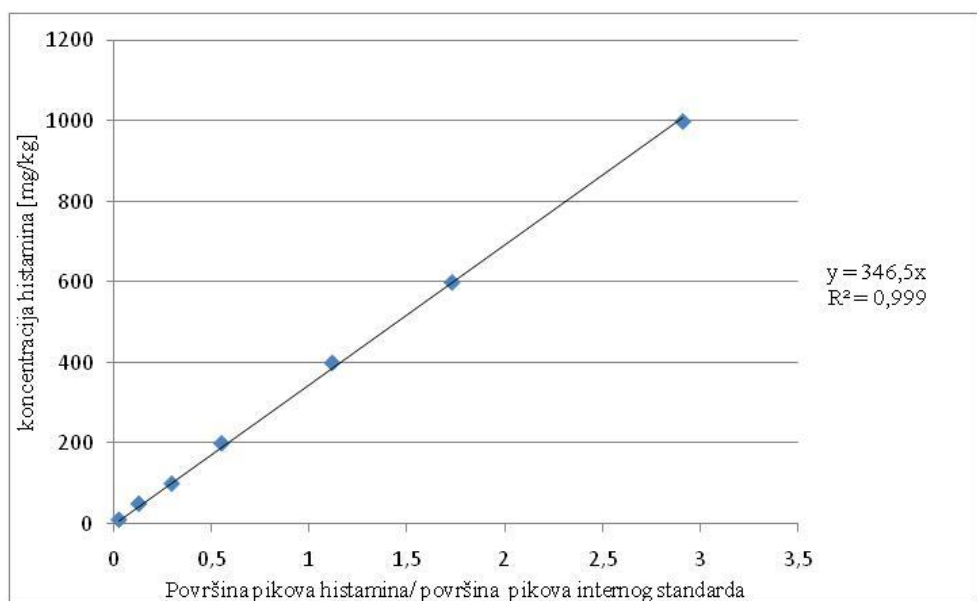
Sva mjerenja udjela histamina HPLC metodom provedena su u duplikatu, a za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost, standardna devijacija te odstupanje od standardne devijacije.

Identifikacija histamina provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (R_t) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektra. Baždarni pravac konstruiran je pomoću otopine histamina različitih koncentracija uz dodatak internog standarda (Imidazol) te su spojevi identificirani na temelju retencijskog vremena (slika 8).



Slika 8. Kromatogram otopine internog standarda i histamina koncentracije 100 mg kg^{-1}

Kvantifikacija histamina provedena je na temelju baždarnog pravca koji je prikazan slikom 9. Baždarni pravac konstruiran je linearnom regresijom iz odnosa koncentracije histamina i omjera površine pikova histamina i internog standarda te mu je pridružena odgovarajuća jednadžba pravca i izračunat koeficijent korelacije (R^2).



Slika 9. Ovisnost koncentracije histamina o omjeru površina histamina i internog standarda

Što je koeficijent determinacije bliži 1, prilagodba linearnog modela podacima je bolja te se može zaključiti da dobiveni podaci veoma dobro opisuju stvarni sastav histamina u standardima pa se prema tome mogu koristiti za identifikaciju histamina u uzorcima ribe. Tablica 2 donosi podatke za baždarni pravac za HPLC metodu.

Tablica 2. Podaci za baždarni pravac za HPLC metodu

Jednadžba pravca	$y = 346,5x$
Nagib	346,5
Odsječak	0
Broj mjerenja	7
Koeficijent korelacije	0,999

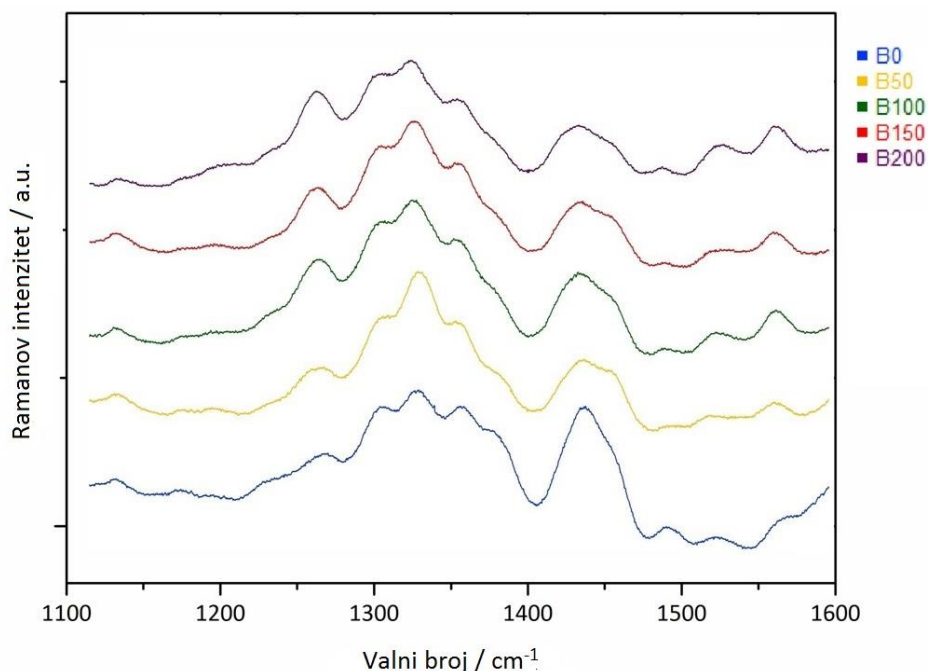
Tablica 3. Rezultati dobiveni analizom uzoraka mariniranog inćuna sa dodanom različitom koncentracijom histamina HPLC metodom

Uzorak (prema dodanoj konc. histamina u ribi)	Srednja vrijednost	SD	RSD
1	0,00		
2	15,2904	0,0246	0,1611
3	25,9214	0,3098	1,1952
4	43,9108	0,3621	0,8248
5	74,5262	2,3921	3,2097
6	109,2373	1,4913	1,3652
7	144,2927	1,9129	1,3257

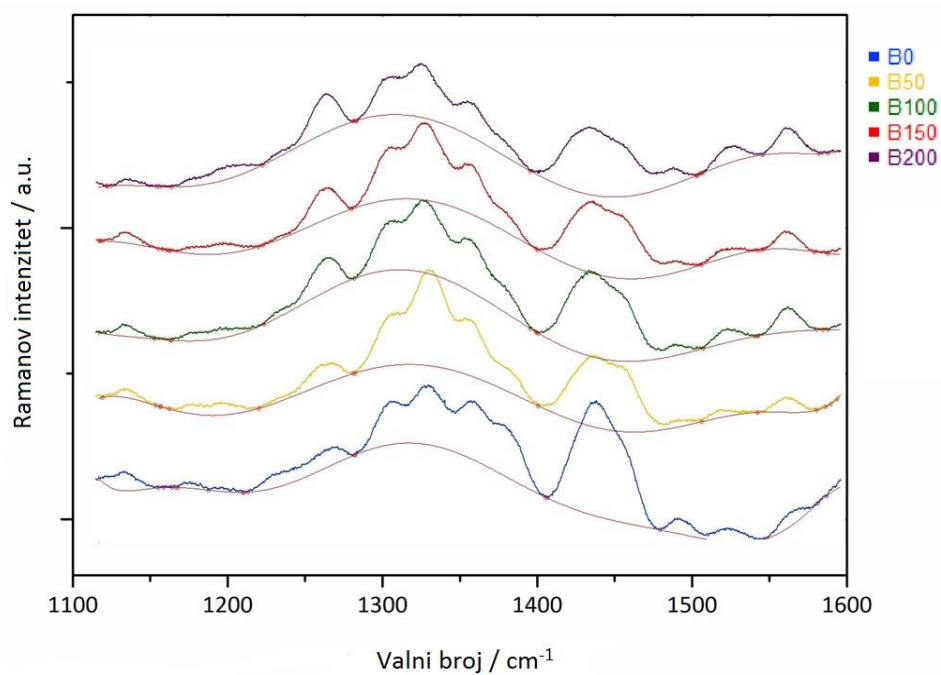
4.1.2. Udjel histamina kvantificiran SERS metodom

Prije izrade kalibracijskih modela, snimljene SERS spektre potrebno je obraditi. SERS spektar, uz signale analita, sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, šuma, fluorescencije te pozadinskog signala samog detektora. Nadalje, apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisi o brojnim parametrima čija je kontrola često zahtjevna tijekom eksperimenta, a to su primjerice oscilacije lasera. Kako bi se navedeni utjecaji eliminirali, provedena je optimizacija parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma te normalizaciju spektra (slika 10, 11, 12, 13, 14).

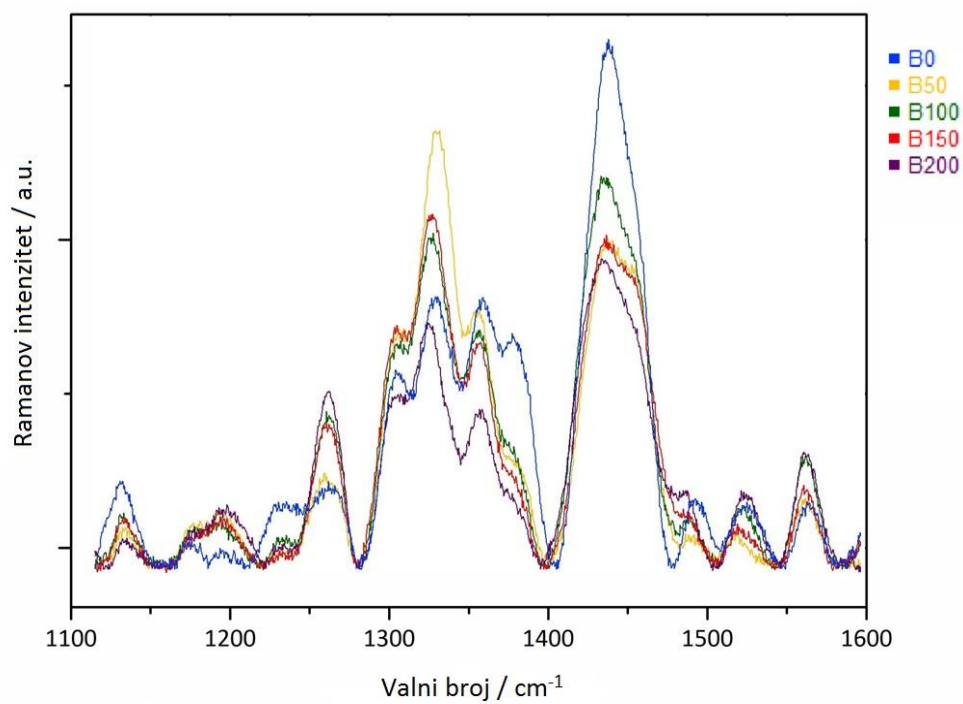
Isprobano je više načina predobrade spektara, međutim kao najbolji pokazala se obrada SERS spektra u programu LabSpec 6 (Horiba Scientific). „*Baseline correction*“ funkcija korištena je za korekciju pozadinskog signala na način da je automatski odabrano 40 reprezentativnih točaka u SERS spektru kojima je prilagođen polinom 9. stupnja (eng. *curve fitting*). Procijenjeni pozadinski signal oduzima se od snimljenog spektra. Zatim su SERS spektri izgladeni (eng. *spectral smoothing*) primjenom Savitzky Golay algoritma sa širinom prozora $W = 20$ i redom interpolacijskog polinoma $M = 2$ s ciljem povećanja omjera signala i šuma. Uslijedila je normalizacija spektra pri čemu je kao interni standard korišten intenzitet vrpce na 1437 cm^{-1} prethodno asigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu.



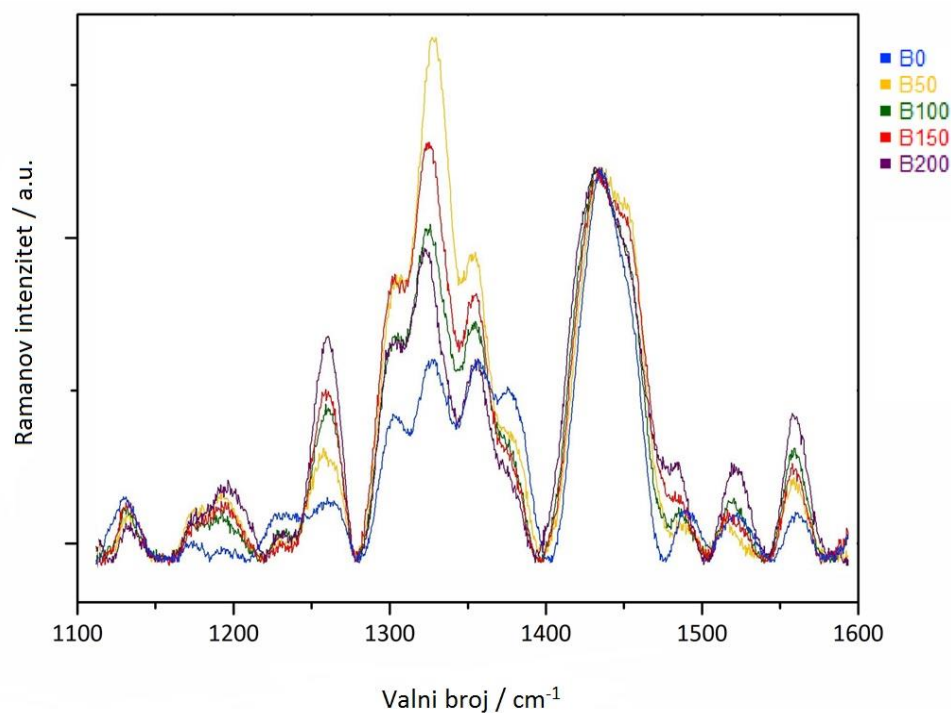
Slika 10. Neobrađeni SERS spektar



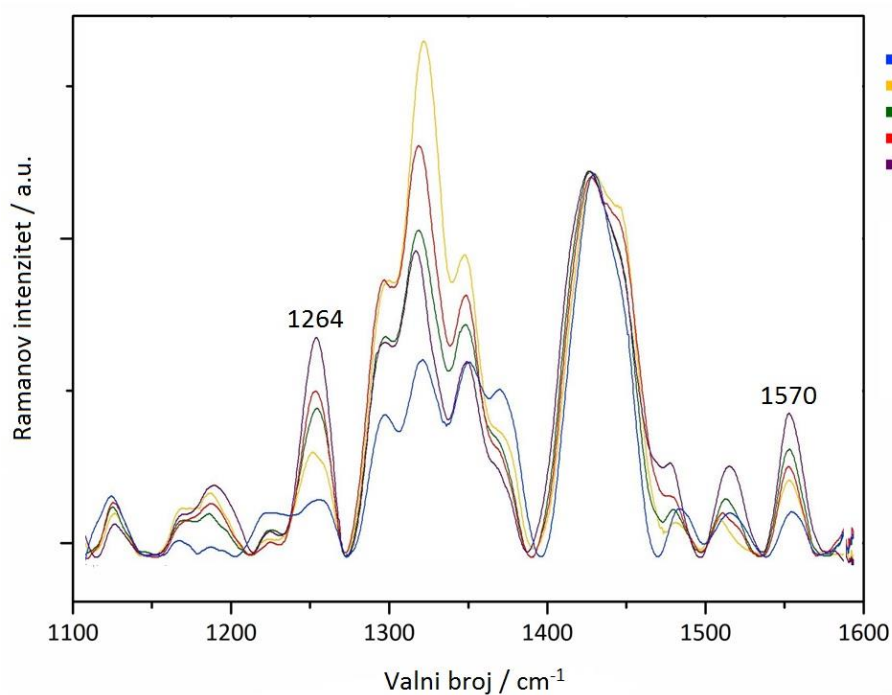
Slika 11. Korekcija pozadinskog signala - aproksimacija bazne linije



Slika 12. Korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimativnog signala



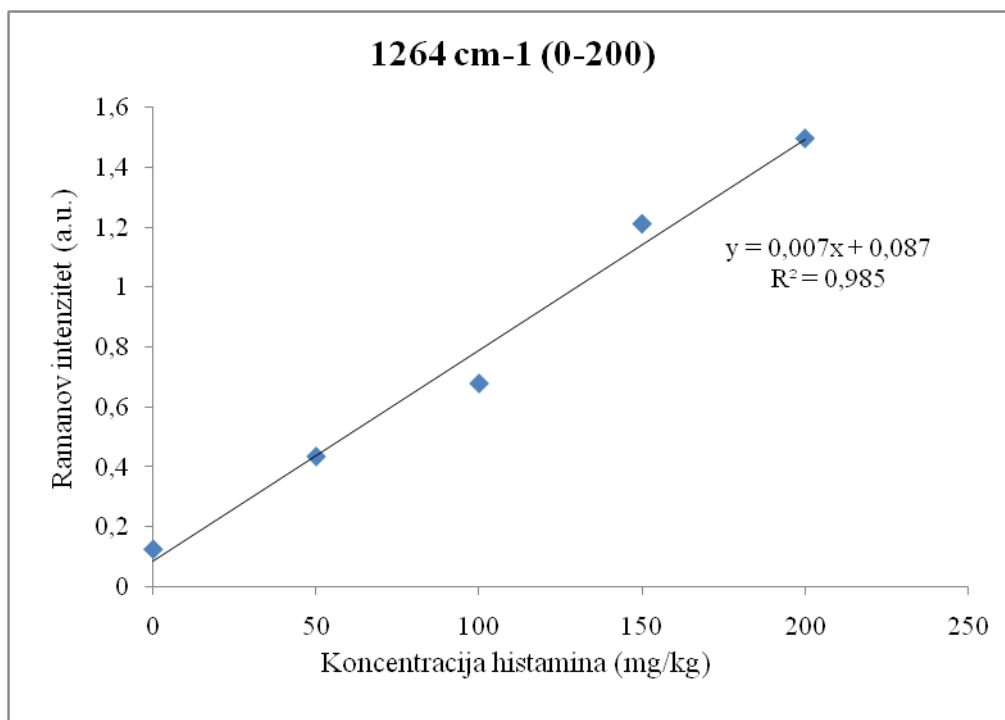
Slika 13. Korekcija šuma



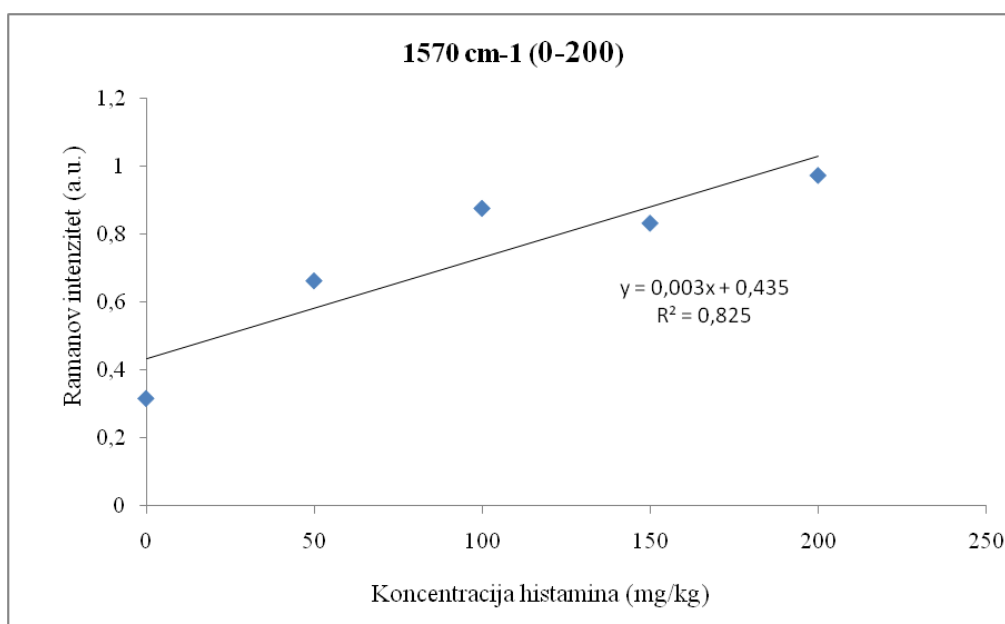
Slika 14. Normalizacija spektra

Nakon obrade spektara konstruiranje baždarni pravac. Dodane koncentracije histamina u baždarnim uzorcima iznosile su 0, 50, 100, 150, 200, 250 i 300 mg kg⁻¹. Za izradu kalibracijskih modela korištene su srednje vrijednosti intenziteta vrpci na 1264 i 1570 cm⁻¹, a baždarni pravac konstruiran je metodom linearne regresije. Valjanost kalibracijskih modela

procijenjena je na temelju koeficijenta korelacije (R^2). Baždarni pravci prikazani su na slikama 15 i 16.



Slika 15. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina na 1264 cm⁻¹



Slika 16. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina na 1570 cm⁻¹

Iz navedenih grafičkih prikaza može se zaključiti kako je kalibracijski model temeljen na intenzitetu vrpce 1264 cm⁻¹ reprezentativniji model (koeficijent korelacije bliži jedinici

odnosno $R^2 = 0,985$) u odnosu na model temeljen na intenzitetu vrpce histamina temeljenom na 1570 cm^{-1} ($R^2 = 0,825$), međutim u nastavku su prikazani rezultati za oba modela.

Za provjeru kalibracijskih modela pripremljeni su realni uzorci marinirane ribe u kojima je histamin nastao prirodnim putem (kvarenjem). Za svaki uzorak provedena su 4 paralelna mjerenja pri čemu je kod svakog mjerenja snimljeno 5 spektara te je kao rezultat uzeta srednja vrijednost intenziteta karakterističnih vrpca histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} . Spektri su obrađeni na isti način kao i spektri baždarnih uzoraka. Kao referentne vrijednosti za koncentraciju histamina, uzete su vrijednosti dobivene HPLC-om.

U Tablici 4 prikazani su rezultati za realne uzorke.

Tablica 4. Rezultati HPLC i SERS analize realnih uzoraka

Uzorak	Metoda	Broj Mjerenja	Srednja vrijednost	SD	RSD	Analitički prinos (%)
1	HPLC	4	0,00			
	SERS 1264	4	3,7285	9,3069	249,6113	
	SERS 1570	4	3,1166	7,3048	234,3808	
2	HPLC	4	15,2904	0,0246	0,1611	100
	SERS 1264	4	16,7642	4,1623	24,8284	109,64
	SERS 1570	4	19,8666	6,6833	33,6408	129,93
3	HPLC	4	25,9214	0,3098	1,1952	100
	SERS 1264	4	29,1214	2,0975	7,2027	112,34
	SERS 1570	4	23,7	4,6308	19,5393	91,43
4	HPLC	4	43,9108	0,3621	0,8248	100
	SERS 1264	4	48,0857	3,8385	7,9827	109,51
	SERS 1570	4	40,2833	6,7789	16,8280	91,74
5	HPLC	4	74,5262	2,3921	3,2097	100
	SERS 1264	4	77,4785	5,8348	7,5309	103,96
	SERS 1570	4	68,3666	3,3719	4,9322	91,73
6	HPLC	4	109,2373	1,4913	1,3652	100
	SERS 1264	4	113,3357	6,5531	5,7820	103,75
	SERS 1570	4	113,2833	10,6401	9,3925	103,70
7	HPLC	4	144,2927	1,9129	1,3257	100
	SERS 1264	4	146,1928	13,5055	9,2381	101,32
	SERS 1570	4	149,5333	4,8151	3,22	103,63

4.2. RASPRAVA

4.2.1. Usporedba rezultata dobivenih SERS i HPLC metodom

Temeljni uvjet za uspješnu primjenu svake analitičke metode je mogućnost precizne i točne analize u realnim uvjetima. Rezultati provedenog istraživanja udjela histamina u uzorcima ribe primjenom SERS metode u suglasju su s rezultatima do kojih je došao Janči (2016), a prema kojima se primjenom ove metode mogu postići vrlo dobri rezultati uz znatno smanjenje kako troškova tako i vremenskog trajanja analize.

Nakon snimanja i obrade dobivenih spektara, jasno su vidljive vrpce histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} (slika 14) iz čega se može zaključiti kako su primjena AGC koloida asigiranog citratnim ionima i ekstrakcija histamina 0.4 M perkloratnom kiselinom uspješne. Ovi su rezultati u skladu s istraživanjem Jančija i sur. (2017) gdje se provodi optimizacija parametara Raman spektroskopije, koristeći AGC koloid za određivanje histamina u tkivu skuše.

Autori u svojem radu najveći intenzitet histaminske vrpce također zapažaju na 1268 i 1570 cm^{-1} , a to pripisuju vibracijama istezanja imidazolnog prstena histamina. U samostalnom istraživanju Janči (2016) uspoređuje spektre mješavine AGC koloida, NABH_4 i otopine molekula histamina sa spektrom mješavine AGC koloida, NABH_4 i vode (slijepa proba) te uočava vrpce izrazito jakog intenziteta na 1268, 1320 i 1570 cm^{-1} .

Kalibracijski modeli konstruirani su metodom linearne regresije te su vrlo dobri rezultati postignuti kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm^{-1} , budući da je koeficijent korelacije $R^2 = 0,985$ dok je isti niži kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} ($R^2 = 0,825$). Dobiveni rezultati u suglasju su s rezultatima Jančija (2016), a iz baždarnih dijagrama (slika 15 i 16) vidljivo je da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što također potvrđuje rezultate Jančija (2016).

Kako je svrha ovog istraživanja validacija metode za određivanje histamina u ribi koju su razvili Janči i sur. (2017), usporedbom dobivenih rezultata za HPLC i SERS analizu (tablica 4) raspraviti će se preciznost i ponovljivost te točnost ovih metoda uz navođenje prednosti jedne i druge metode.

Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira da je određena analitička metoda prikladna za namijenjenu svrhu, a uključuje određivanje i optimizaciju parametara te metode s ciljem utvrđivanja njezine prikladnosti za dobivanje željenih informacija. Postupci validacije razlikuju se ovisno o analitu te svaka metoda zahtjeva individualan pristup.

Preciznost (engl. *precision*) pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim propisanim uvjetima. Obično se provodi 5-6 mjerenja na 2-3 različite koncentracije. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost (reproducibilnost) (Lazarić, 2012).

U tablici 4 mogu se uočiti srednje vrijednosti za izmjerene koncentracije histamina koje su u opsegu od $15,29 \text{ mg kg}^{-1}$ do $149,53 \text{ mg kg}^{-1}$ što je unutar zadanih parametara razvijene metode od 0 do 200 mg kg^{-1} . Standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) govore o preciznosti HPLC odnosno SERS metode.

Standardna devijacija za sve uzorke manja je kod HPLC-a nego kod SERS metode. Nadalje, RSD vrijednosti za HPLC metodu kreću se u rasponu od 0,16% ($15,29 \pm 0,02 \text{ mg kg}^{-1}$) do 3,21% ($74,53 \pm 2,39 \text{ mg kg}^{-1}$) pri čemu uzorci 2 i 5 imaju RSD vrijednost izvan RSD vrijednosti zadanih granica prihvatljivosti od 0,5 do 2% što znači da je preciznost HPLC metode dobra, ne izrazito visoka.

S obzirom na R^2 vrijednost baždarnih pravaca za SERS analizu, zaključeno je da je bolji kalibracijski model onaj koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm^{-1} pa su sukladno tome RSD vrijednosti manje nego kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1570 cm^{-1} osim kod uzorka 5 i 7.

Gledajući RSD vrijednosti za obje metode, HPLC metoda ima puno veću preciznost od SERS metode budući da su RSD vrijednosti za oba modela (1264 i 1570 cm^{-1}) relativno visoke. Slično zapaža i Janči (2016) koji u svojem istraživanju zaključuje da HPLC ima izrazito visoku preciznost prema SERS metodi. Razlog zbog kojeg HPLC, kao i ostale kromatografske tehnike, ima veću preciznost je taj što se tijekom kromatografske analize komponente uzorka razdvajaju na kromatografskoj koloni i zasebno detektiraju nakon izlaska iz kolone, dok s druge strane, SERS supstrati nisu toliko selektivni i u spektru su vidljive komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata i agregirajućeg sredstva.

Točnost (engl. *accuracy*) metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2012). Rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak iskoristivosti, odnosno analitički prinos (engl. *recovery*). Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina, a u ovom radu procjena se temelji na usporedbi

rezultata ispitivane metode (SERS) s rezultatima dobivenim uhodanom referencijskom metodom (HPLC).

U Tablici 4 prikazani su rezultati za točnost obje metode, a dobiveni su na način da se izračuna analitički prinos (omjer) srednjih vrijednosti izmjerenih koncentracija histamina dobivenih SERS analizom i srednjih koncentracija histamina izmjerenih HPLC metodom te se izrazi kao postotak. Pritom se rezultati HPLC-a uzimaju kao apsolutno točni (100%) jer dobiveni koeficijent korelacije baždarnog pravca iznosi 0,999 što pokazuje dobru točnost te metode odnosno HPLC metoda je referentna.

Kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1570 cm^{-1} odstupanja od referentne vrijednosti kreću se od 3,63 % do 29,93% dok se iste kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce 1264 cm^{-1} kreću u rasponu od 1,32 do 12,34% te su ovi rezultati točniji (manja su odstupanja od referentne vrijednosti za pojedine uzorke).

Iz svega navedenoga, proizlazi da je HPLC metoda preciznija i točnija od SERS metode. Ipak, primjenom SERS metode za analizu i kvantifikaciju histamina u tkivu ribe također se mogu dobiti dobri rezultati budući da su određene RSD vrijednosti niske te je točnost blizu 100%.

4.2.2. Usporedni prikaz tijeka postupka kod SERS i HPLC metode

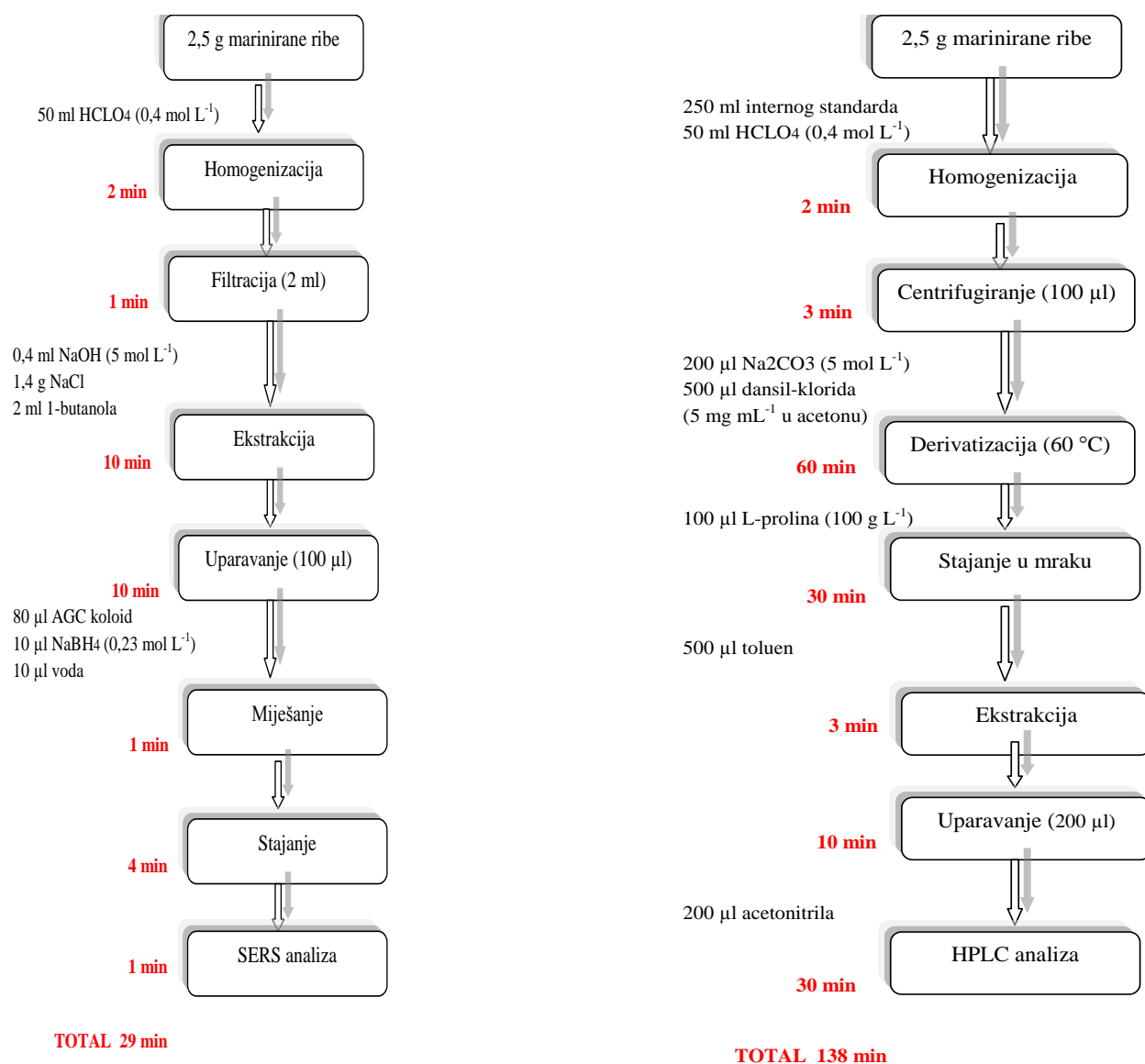
Nesporno je kako su robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost prednosti laboratorijskih metoda poput HPLC-a, ali i njihovo svojevrsno ograničenje budući da im je iz tih razloga primjena uglavnom ograničena na analitičke laboratorije (u znanstvene ili regulatorne svrhe). K tome, njihovu primjenu u industrijskim kontrolnim laboratorijima uvelike ograničavaju činjenice da je za njihovu provedbu potrebna izrazito skupa laboratorijska oprema i instrumenti koji zahtijevaju skupo održavanje te osoblje koje je specifično educirano za rad na takvoj opremi.

Osim toga, postupak pripreme uzoraka vrlo je složen i dugotrajan (nekoliko sati) te u realnom vremenu nije moguće analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe.

S druge strane, upravo ovi uvjetno kazani nedostaci HPLC-a predstavljaju prednosti razvijene SERS metode kojom je značajno pojednostavljen postupak analize. Također, zbog činjenice da SERS metoda ne zahtijeva postupak derivatizacije histamina te reakciju s L-prolinom koje traju ukupno 90 min, osjetno je skraćeno vrijeme potrebno za analizu jednog

uzorka (≈ 30 minu odnosu na ≈ 140 min koliko je potrebno za HPLC metodu). I sam postupak analize odnosno snimanja SERS spektra je kraći i traje 1 min, dok je za HPLC analizu potrebno 30 min.

Slika 17 donosi usporedni prikaz tijeka postupaka analize histamina SERS metodom i referentnom HPLC metodom (Malle i sur., 1996) sa stajališta složenosti odnosno broja i vremenskog trajanja postupaka.



Slika 17. Usporedba tijeka postupaka i vremenskog trajanja analize jednog uzorka histamina SERS metodom (lijevo) i referentnom HPLC metodom (desno)

Za provođenje SERS analize potreban je manji broj jednostavnih i lako dostupnih kemikalija, dok postupak HPLC analize zahtijeva veći broj kemikalija kod kojih značajna stavka može biti trošak nabave (interni standard, sredstvo za derivatizaciju).

Kako su danas na tržištu dostupni mali Ramanovi spektrometri, čija je cijena višestruko niža od cijene tekućinskih kromatografa, može se zaključiti da je i trošak SERS analize po uzorku značajno manji od troška HPLC analize uslijed troškova nabave analitičkih instrumenata i potrošnog materijala.

Iako SERS metoda prednjači u ovim karakteristikama, najvažnije je osigurati preciznu i točnu analizu u realnim uvjetima (npr. industrijskim).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. U ovom radu provedena analiza realnih uzoraka razvijenom SERS metodom i referentnom HPLC metodom uz usporedbu dobivenih rezultata, pokazala je izrazitu preciznost HPLC metode, dok je varijabilnost uzoraka dovela do relativno visokih vrijednosti RSD dobivenih SERS metodom.
2. Koeficijent korelacije najveći je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} i iznosi $R^2=0,985$ a intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina.
3. Kako koeficijent korelacije standardnog modela dobivenog HPLC metodom iznosi $R^2=0,999$ može se zaključiti da je model temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} reprezentativniji i vrlo blizu standardnog modela te se s visokom pouzdanošću može koristiti za analizu i kvantifikaciju histamina u uzorcima marinirane ribe.
4. Usporedbom dobivenih rezultata SERS analize, uočeno je da je najveća točnost postignuta primjenom modela koji se temelji na intenzitetu SERS vrpce histamina na 1264 cm^{-1} .
5. U usporedbi s referentnom HPLC metodom, SERS metoda omogućava analizu histamina u uzorcima ribe uz značajno smanjene troškove te skraćuje vrijeme potrebno za analizu.

6. LITERATURA

ANON (2005) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sparus aurata*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Colloca, F.; Cerasi, S. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. 2005, <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/>. Pristupljeno 5.4.2017.

Anonymus (2016) Ramanov spektrometar Horiba Jobin Yvon T64000, <<http://ccu.kirensky.ru/info/p2/img/horiba.jpg>>. Pristupljeno 28.8.2017.

Bogdanović, T., Lelas, S., Listeš, E., Šimat, V. (2009) Histamini i biogeni amini kao indikatori svježine ribe i ribljih proizvoda. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **XI**(5), 291-295, <<http://hrcak.srce.hr/52501>>. Pristupljeno 22.3.2017.

Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H.C., Dykes, G.A. (2009) Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation – A Review. *Food Sci. Nutr.* **49**(4), 369-377.

Dalgaard, P., Emborg, J., Kjølby, A., Sørensen, N.D., Ballin, N.Z. (2008) 15-Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. In: *Improving Seafood Products for the Consumer*, (Børresen, T. ed.), Woodhead Publishing.

Dalgaard, P., Emborg, J. (2009) Histamine fish poisoning-new information to control common seafood safety issue. In: *Foodborne pathogens – Hazards, risk analysis and control*, 2nd edition, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, 292-324.

Erim, B.F. (2013) Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends. Anal. Chem.* **52**:239-247.

Ferraro, J. R. (2003) *Introductory Raman spectroscopy*, 2nd edition, Academic Press.

Janči, T. (2016) Mogućnost primjene Raman spektroskopije pri kontroli kvalitete ribe. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Janči, T., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Mikac, L., Vidaček, S., Ivanda, M. (2016) Determination of histamine in fish by Surface Enhanced Raman Spectroscopy using silver colloid SERS substrates, *Food Chem.* **224**, 48-54, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.032>

Janči, T., Mikac, L., Ivanda, M., Marušić Radovčić, N., Medić, H., Vidaček, S. (2017) Optimization of parameters for histamine detection in fish muscle extracts by surface-

enhanced Raman spectroscopy using silver colloid SERS substrates. *J. Raman Spectrosc.* **48**,64-72, doi:10.1002/jrs.4991.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., Tsukamoto, T. (2004) Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning incident. *Int. J. Food Microbiol.* **92**,79-87.

Karovičova, J., Kohajdova, Z. (2005) Biogenic amines in food. *Chemical Papers* **59**(1), 70 - 79.

Koral, S., Tufan, B., Ščavničar, A., Kočar, D., Pompe, M., Kose, S. (2013) Investigation of the contents of biogenic amines and some food safety parameters of various commercially salted fish products. *Food Control* **32**:597- 606.

Kuley, E., Ozogul, F., Ozogul, Y. (2005) Effects of aluminium foll and cling film on biogenic amines and nucleotide degradation products in gutted sea bream stored at 2±1°C. *Eur. Food Res. Technol.* **221**:582- 591.

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**,61-65.

Lee, P.C., Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **86**,3391-3395.

Lalić, M. (2013) Razvoj i validacija HPLC metode za određivanje sadržaja 10-hidroksi-2-decenske kiseline u proizvodima s matičnom mliječi. Rektorova nagrada, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <www.unizg.hr/rektorova/upload_2013/Sazetak.doc. Pristupljeno 12.5.2017.

Lee, P.C., Meisel, D. (1982) *J. Phys. Chem.*, **86** (1982) 3391-3395.

Lehane, L., Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**:1-37.

Long, D.A. (2002) The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by *Molecules*, Wiley.

Luterotti, S. (2009) Uvod u kemijsku analizu, 3. izd., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Maintz, L., Novak, N. (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nut.* **85**:1185-1196.

Malle, P., Valle, M., Bouquelet, S. (1996) Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Internat.* **79**, 43-49.

- Mathies, R. A. (1995) Biomolecular vibrational spectroscopy. *Method. enzymol.* **246**,377-389.
- Mendes, R. (2009) Biogenic amines. In: Fishery products Quality, Safety and Authenticity, (Rehbein, H., Oehlenschlager, J., eds.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 42-67.
- Mikac, L. (2016) Površinski pojačano Ramanovo raspršenje: od koloidne otopine do stabilnog supstrata. Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, <://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A156>. Pristupljeno 13.5.2017.
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G.C., Bremer, P.J., Meerdink, G., Morton, R.H. (2011) Biogenic amines and potential histamine- forming bacteria in Rihaakuru (a cooked fish paste). *Food Chem.* **128**:479- 484.
- Nosić, M. (2010) Histaminsko otrovanje morskom ribom. *Croat.J. Food sci. technology* [online] **2**(1),26-31, <<http://hrcak.srce.hr/59551>>. Pristupljeno 12.5.2017.
- Nosić, M., Krešić, G. (2015) Plava riba – prednosti ali i neki rizici konzumiranja. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* [online] **4**(1), 16-27, <<http://hrcak.srce.hr/147061>>. Pristupljeno 12.5.2017.
- Önal, A. (2007) A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* **103**,1475-1486.
- Park, J.S., Lee, C.H., Kwon, E.Y., Lee, H.J., Kim, Y.J., Kim, S.H. (2010) Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Contr.* **21**:1219-1226.
- Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008) *Narodne novine* 74, Zagreb.
- Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products Meeting report (2013) FAO/WHO, <www.fao.org/fileadmin/user_upload/agms/news.../Histamine_Final_Report.pdf>. Pristupljeno 5.4.2017.
- Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin (2004) *EU Official Journal of the European Union* **226**,22-82.
- Rivas, B., Gonzalez, R., Landete, J.M., Muñoz, R. (2008) Characterization of a second ornithine decarboxylase isolated from *Morganella morganii*. *J. Food Prot.* **71**(3):657-661.

Rossi, S., Lee, C., Ellis, P.C., Pivarnik, L.F. (2002) Biogenic amines formation in bigeye tuna steaks and whole skipjack tuna. *J. Food Sci.* **67**,2056-2060.

Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods (2011) European Food Safety Authority, *EFSA Journal* **9**(10):2393, <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2393/epdf>>. Pristupljeno 20.4.2017.

Scombrototoxin (Histamine) formation FDA (1996) in: Fish and Fisheries Products Hazards and Control Guide: First Edition, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood: First Edition, pp. 7-43, 69- 83.

Scombrototoxin (Histamine) Formation FDA (2011) in: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance fourth ed., (pp. 113 - 152). Washington, DC, USA: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutr., Office of Food Safety.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, H.F. (1999) Osnove analitičke kemije, prvo izd. (preveli Kujundžić, N., Živčić-Alegratti, V., Živković, A.) Školska knjiga, Zagreb.

Šimat, V. (2010) Usporedba dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u ribi. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu* [online] **XII**(6), 333-341, <<http://hrcak.srce.hr/66432>>. Pristupljeno 22.4.2017.

Šimat, V. (2010a) Promjene parametara kvalitete u filetu hladno mariniranog inćuna (*Engraulis encrasicolus*, L.). Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šimat, V. (2011) Parametri kvalitete u proizvodima ribarstva. Zbornik radova 5. Konferencija o sigurnosti i kakvoći hrane u RH, HGK, Opatija, 16-18. svibanj 2011.

Taylor, S.L. (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev.Toxicol.* **17**,91-128.

Uredba Komisije(EZ) br. 2073/2005od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu (SL L 338, 22. 12. 2005.), <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32005R2073>> Pristupljeno 13.5.2017.

Vidaček, S. (2014) Chapter 8 - Seafood. In: Lelieveld, Y. M. (Ed.), Food Safety Management (pp. 189-212). San Diego: Academic Press.